

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur  
Biosynthese der Atmungsketteninhibitoren Myxothiazol und Melithiazol

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Stefan Weinig

aus Bad Kreuznach

1. Referent: Privatdozent Dr. Rolf Müller

2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 11.09.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 05.11.2003

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftliche Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blöcker, H., Höfle, G., Beyer, S. and Müller, R. (1999). New lessons for combinatorial biosynthesis from Myxobacteria. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 37391-37399

Weinig, S., Hecht, H.J., Mahmud, T. and Müller, R. (2003). Melithiazol and Myxothiazol biosynthesis in Myxobacteria: further insights into hybrid PKS/NRPS multienzyme systems and evidence for a new subclass of SAM-dependent methyltransferases. *Chemistry & Biology in press*

Weinig, S. Mahmud, T. and Müller, R. (2003). Markerless in frame deletions and point mutations in the Myxothiazol biosynthetic genes provide evidence for a delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain. *Chemistry & Biology in press*

### Tagungsbeiträge

Weinig, S. und Müller, R.: Zielgerichtete Mutagenese in *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1: Charakterisierung des Myxothiazolbiosynthese-Genclusters. (Poster 5) Workshop der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, 24.-26.09.2000, Bonn

Weinig, S., Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B. and Müller, R.: Genetic and biochemical analysis of Myxothiazol and Myxochelin formation. (Poster 10) International Interdisciplinary Conference Polyketides III 10.-13.09-2001, Bristol, U.K.

Weinig, S., Sasse, F., Blöcker, H., Höfle, G. and Müller, R.: Comparison of the biosynthetic pathways to the myxobacterial antibiotics Myxothiazol and Melithiazol (Poster), Jahrestagung der VAAM, 24.-27.03.2002, Göttingen

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Mikroorganismen als Naturstoff-Produzenten	1
1.2 Allgemeine Beschreibung der Myxobakterien	3
1.3 Biosynthese bakterieller Naturstoffe durch Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen	4
1.3.1 Funktionsweise von Polyketidsynthasen	4
1.3.2 Funktionsweise von nichtribosomalen Peptidsynthetasen	9
1.4 Die Atmungsketteninhibitoren Myxothiazol und Melithiazol	12
1.5 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	15
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Chemikalien	16
2.2 Enzyme, "Kits" und Nukleinsäuren	18
2.3 Puffer und Stammlösungen	19
2.4 Medien zur Kultivierung von Bakterien	27
2.5 Geräte und Materialien	29
2.6 Bakterienstämme, Plasmide und Primer	31
2.6.1 Verwendete Bakterienstämme	31
2.6.1.1 <i>E. coli</i>	31
2.6.1.2 Myxobakterien	32
2.6.2 Plasmide	33
2.6.3 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide	34
2.6.4 Oligonukleotide	37
2.7 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen	39
2.7.1 <i>Escherichia coli</i>	40
2.7.2 <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW 4/3-1 und davon abgeleitete Mutanten	40
2.7.3 <i>Melittangium lichenicola</i> Me 146	40
2.7.4 <i>Myxococcus fulvus</i> Mx f333/8	41
2.8 Isolierung prokaryontischer DNA	41
2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Myxobakterien	41
2.8.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der "boiling method"	42
2.8.3 Präparation von Plasmid-DNA mit dem Nucleospin®Plasmid-Kit	42
2.8.4 Präparation von Cosmid-DNA	43
2.9 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten	43
2.9.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	44
2.10 Reinigung, Konzentrierung, und Quantifizierung von DNA	44
2.10.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	44
2.10.2 Fällung von DNA	45
2.10.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Nucleospin®Extract "Kits"	45
2.10.4 Quantitative Bestimmung von DNA	45
2.11 Enzymatische Manipulation von DNA	46
2.11.1 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	46
2.11.2 Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zur Erzeugung glatter DNA-Enden	46
2.11.3 Dephosphorylierung von DNA	47
2.11.4 Klonierung von PCR-Produkten	47
2.11.5 Standard-Ligationsverfahren von DNA mit glatten oder kohäsiven Enden	47
2.12 Transformation von <i>E. coli</i>	48
2.12.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	48
2.12.2 Elektroporation von <i>E. coli</i>	48

2.12.3	Kontrolle der Klonierung mit Hilfe der $\alpha$ -Komplementation	49
2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.13.1	Reaktionsbedingungen	50
2.13.1.1	Auswahl der thermostabilen DNA-Polymerase	50
2.13.1.2	Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes	51
2.13.1.3	Standard PCR-Programm	52
2.13.2	Klonierung von PCR-Produkten unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kits	53
2.14	DNA Hybridisierungen	53
2.14.1	Herstellung von DNA-Sonden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes	53
2.14.2	Southern Blot	54
2.14.3	Hybridisierung und Detektion mit Hilfe des DIG-Systems	55
2.15	Genetische Manipulation von <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	55
2.15.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	55
2.15.2	Elektroporation	56
2.15.3	Weichagarplattierung	56
2.15.4	Erzeugung von markerlosen Mutationen über zweifache homologe Rekombination	57
2.16	Konstruktion einer Cosmidgenbank von <i>Melittangium lichenicola</i> Me l46	57
2.16.1	Behandlung der genomischen DNA	57
2.16.2	Manipulation des Cosmid-Vektors SuperCos I	58
2.16.3	Koloniehybridisierung	59
2.16.4	Transfer der Kolonien ("Abklatsch")	59
2.17	Screening der Cosmidgenbank mit Hilfe der PCR	60
2.18	Computergestützte Analyse von DNA-Sequenzen	60
2.19	Enzymologische Untersuchungen	61
2.19.1	Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte	61
2.19.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	61
2.19.3	Pufferaustausch bzw. Konzentrierung von Proteinextrakten	62
2.19.4	Reinigung chitinbindender Intein-Fusionsproteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie	62
2.19.5	SDS-PAGE-Gelelektrophorese	63
2.19.5.1	Probenvorbereitung	63
2.19.5.2	Herstellung der Gelmatrices und Elektrophorese	64
2.19.5.3	Detektion der Proteinbanden	64
2.20	Analytik der von <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 produzierten Sekundärmetabolite	65
2.20.1	Dioden Array gekoppelte Hochleistungsflüssigchromatographie (DAD-HPLC)	65
2.20.2	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Masse-Detektor (HPLC-MS)	67
2.21	Fütterung von isotopenmarkierten Vorstufen	67
2.21.1	Fütterung von D8-DL-Valin	67
2.21.2	Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin	68
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
3.1	Klonierung des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters	69
3.2	Das Myxothiazol-Biosynthesegencluster	70
3.3	Analyse der <i>mta</i> Gene	72
3.4	Modulare Struktur der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten Proteine	73
3.5	Analyse der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten Domänen	76
3.5.1	Analyse der $\beta$ -Ketoacylsynthase Domänen	76
3.5.2	Analyse der Acyltransferase Domänen	77
3.5.3	Analyse der $\beta$ -Ketoacylreduktase Domänen	78
3.5.4	Analyse der $\beta$ -Hydroxy-Dehydratase Domänen	79
3.5.5	Analyse der vermuteten O-Methyltransferase Domänen	79
3.5.6	Analyse der Acyl Carrier Protein und Peptidyl Carrier Protein Domänen	80
3.5.7	Analyse der Kondensationsdomäne	81
3.5.8	Analyse der Adenylierungsdomänen	82
3.5.9	Analyse der Heterozyklisierungsdomänen	83
3.5.10	Analyse der potentiellen Oxidationsdomänen	84
3.5.11	Analyse der Monooxygenase Domäne	85

3.5.12	Analyse der Thioesterase Domäne	86
3.6	Analyse der stromabwärts des <i>mta</i> Clusters gelegenen offenen Leserahmen	86
3.7	Mutageneseverfahren zur Erzeugung von markerlosen Mutationen unter Erhalt des Leserahmens	87
3.7.1	Allgemeiner Ablauf der Mutagenesen zur Erzeugung von markerlosen Mutationen und Deletionen unter Erhalt des Leserahmens	88
3.7.2	Konstruktionsbeschreibung diverser Mutageneseplasmide	89
3.8	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten Enoylreduktase Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB	91
3.8.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW25	93
3.8.2	Konstruktion der <i>mtaB</i> -Mutante (L1666A, R1671K, G1672A, G1673L)	93
3.8.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	94
3.9	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der $\beta$ -Ketoreduktase Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB	94
3.9.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW41	95
3.9.2	Konstruktion der <i>mtaB</i> -Mutante (G1860I, G1861I, G1863V)	95
3.9.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	96
3.10	Untersuchungen zur Bildung der Bisthiazoleinheit im Myxothiazol	96
3.10.1	Deletion der FMN-Bindedomäne in MtaC	96
3.10.1.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW33	97
3.10.1.2	Konstruktion der <i>mtaC</i> $\Delta$ Ox <sub>3280-3919</sub> Mutante	98
3.10.1.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	100
3.10.2	Deletion der FMN-Bindedomäne in MtaD	101
3.10.2.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW36	102
3.10.2.2	Konstruktion der <i>mtaD</i> $\Delta$ Ox <sub>3599-4430</sub> Mutante	102
3.10.2.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	103
3.11	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Entstehung der Bisthiazoleinheit	103
3.11.1	<i>In vitro</i> Test mit der Ox Domäne von MtaC	105
3.12	Spezifische Inaktivierung der O-Methyltransferase Domänen in MtaE und MtaF	107
3.12.1	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten O-Methyltransferase Domäne von MtaE	107
3.12.1.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW45	108
3.12.1.2	Konstruktion der <i>mtaE</i> Mutante (D1042A; C1045T)	108
3.12.1.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	109
3.12.2	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten O-Methyltransferase Domäne von MtaF	109
3.12.2.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW17	110
3.12.2.2	Konstruktion der <i>mtaF</i> - Mutante (D1002L; C1005T; G1006L)	110
3.12.2.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	110
3.13	Untersuchungen zur Entstehung des endständigen Amides	111
3.13.1	Deletion der Monooxygenasedomäne in MtaG	111
3.13.1.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW24	112
3.13.1.2	Konstruktion der <i>mtaG</i> $\Delta$ MOX <sub>2284-3324</sub> Mutante	112
3.13.1.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	112
3.14	Inaktivierung von <i>mtaH</i> sowohl durch einfache homologe Rekombination als auch durch In-Frame Deletion	113
3.14.1	Spezifische Inaktivierung von <i>mtaH</i> durch einfache homologe Rekombination	113
3.14.2	Spezifische Inaktivierung von <i>mtaH</i> durch In-Frame Deletion	115
3.14.2.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW64	116
3.14.2.2	Konstruktion der <i>mtaH</i> $\Delta$ <sub>333-665</sub> Mutante	117
3.14.2.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	117
3.15	Auffinden und Inaktivierung von <i>mtaX</i> (dem <i>mtaH</i> -Isogen)	117
3.15.1	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	118
3.16	Suche nach dem Melithiazol-Biosynthesegencluster	120
3.17	Ergebnisse der Sequenzanalyse	121
3.17.1	Analyse der <i>mel</i> Gene	121
3.18	Analyse der stromaufwärts des <i>mel</i> Clusters gelegenen offenen Leserahmen	123
3.19	Analyse der stromabwärts des <i>mel</i> Clusters gelegenen offenen Leserahmen	123
3.20	Analyse der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten Domänen	129

3.20.1	Analyse der $\beta$ -Ketoacylsynthase Domänen	129
3.20.2	Analyse der Acyltransferase Domänen	130
3.20.3	Analyse der $\beta$ -Ketoreduktase Domänen	131
3.20.4	Analyse der $\beta$ -Hydroxy-Dehydratase Domäne	132
3.20.5	Analyse der vermuteten O-Methyltransferase Domänen	132
3.20.6	Analyse der Acyl Carrier Protein und Peptidyl Carrier Protein Domänen	133
3.20.7	Analyse der Kondensationsdomäne	133
3.20.8	Analyse der Adenylierungsdomänen	134
3.20.9	Analyse der Heterozyklisierungsdomänen	135
3.20.10	Analyse der potentiellen Oxidationsdomänen	136
3.20.11	Analyse der Monooxygenase Domäne von MelG	136
3.20.12	Analyse der Thioesterase Domäne	137
3.21	Versuche zur genetischen Manipulation von <i>M. lichenicola</i> Me I46	137
3.21.1	Transformation von <i>M. lichenicola</i> Me I46 durch Elektroporation	138
3.21.2	Transformation von <i>M. lichenicola</i> Me I46 durch Konjugation	138
3.22	Heterologe Expression von MelB in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	139
3.22.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pMSW17	140
3.22.2	Konstruktion und Analyse der Mutanten	142
3.23	Substitution der Adenylierungsdomäne in MtaD durch die Adenylierungsdomäne aus MelD	142
3.23.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW241	144
3.23.2	Konstruktion der Mutante	146
3.23.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	148
3.24	Untersuchung zur Entstehung des Methylesters von Melithiazol	148
3.24.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW243	148
3.24.2	Konstruktion der Mutante <i>mtaH::pESW234</i>	150
3.24.3	Analyse der Produktbildung in den Mutanten	152
3.25	Weitere Untersuchungen zu Bildung des terminalen Methylesters	153
3.25.1	Heterologe Expression von MelK und MelJ $\Delta_{108-335}$ in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	154
3.26	Untersuchung zur Herkunft der Startereinheit der Melithiazolbiosynthese durch Fütterung von D8-DL-Valin	156
3.27	Untersuchung zur Herkunft der O-Methylgruppen des Melithiazols durch Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin	157
3.28	Vergleich beider Biosynthesegencluster	158
3.29	Vergleich der A Domäne	158
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>160</b>
4.1	Das Myxothiazol-Biosynthesegencluster	160
4.2	Modell der Myxothiazolbiosynthese	160
4.3	Mutageneseverfahren zur Erzeugung von markerlosen Mutationen unter Erhalt des Leserahmens	167
4.4	Mutagenesen im Myxothiazol-Biosynthesegencluster	169
4.4.1	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten ER Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB	169
4.4.2	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der KR Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB	170
4.4.3	Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten O-Methyltransferase Domänen von MtaE und MtaF	171
4.4.4	Deletion der MOX Domäne in MtaG	173
4.4.4.1	Die MOX Domäne von MtaG katalysiert einen alternativen Kettenfreisetzung-Mechanismus	175
4.4.5	Untersuchungen zur irregulären Lage der Doppelbindungen	176
4.5	Untersuchungen zur Entstehung der Bisthiazoleinheit im Myxothiazol	178
4.5.1	Allgemeine Betrachtung der Heterozyklenbildung	178
4.5.2	Deletion der Oxidationsdomänen von MtaC und MtaD	179
4.5.3	<i>In vitro</i> Experimente zur Entstehung der Bisthiazoleinheit	180
4.6	Modell der Melithiazolbiosynthese	182
4.7	Heterologe Expression von MelB in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	186
4.8	Substitution der A Domäne in MtaD durch die A Domäne aus MelD	188
4.9	Heterologe Expression von MelJ und MelK in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	189

---

4.10	Vergleich des Myxothiazol- und des Melithiazol-Biosynthesegenclusters	191
4.11	Vergleich der an der Myxothiazol- und Melithiazolbiosynthese beteiligten Domänen	192
4.11.1	Phylogenetischer Vergleich der KS Domänen	192
4.11.2	Phylogenetischer Vergleich der AT Domänen	193
4.11.3	Phylogenetischer Vergleich der ACP Domänen	194
4.11.4	Phylogenetischer Vergleich der KR Domänen	195
4.11.5	Phylogenetischer Vergleich der DH Domänen	196
4.11.6	Phylogenetischer Vergleich der O-MT Domänen	196
4.11.7	Vergleich der Ox Domänen	197
4.11.8	Phylogenetischer Vergleich der HC Domänen	198
4.11.9	Die übrigen Domänen der MTAS und der MELS	198
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>199</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>201</b>



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1 Beispiele für mikrobielle Sekundärmetabolite mit pharmakologischer Bedeutung	1
Abbildung 1.2 Übersicht myxobakterieller Sekundärmetabolite	2
Abbildung 1.3 Aktivierung von Acyl Carrier Proteinen und Peptidyl Carrier Proteinen	6
Abbildung 1.4 Ablauf der Polyketidbiosynthese	7
Abbildung 1.5 Die optionalen Domänen von Polyketidsynthasen	8
Abbildung 1.6 Ablauf der nichtribosomalen Peptidbiosynthese	10
Abbildung 1.7 Die optionalen Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen	11
Abbildung 1.8 Die biogenetischen Bausteine des Myxothiazols	13
Abbildung 1.9 Struktureller Vergleich der Atmungsketteninhibitoren Myxothiazol und Melithiazol	13
Abbildung 3.1 Die Genanordnung des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters	72
Abbildung 3.2 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten KS Domänen	76
Abbildung 3.3 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten AT Domänen	78
Abbildung 3.4 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten KR Domänen	79
Abbildung 3.5 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten DH Domänen	79
Abbildung 3.6 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten O-MT Domänen	80
Abbildung 3.7 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten ACP und PCP Domänen	81
Abbildung 3.8 Sequenzanalyse der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten C Domäne	81
Abbildung 3.9 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten A Domänen	82
Abbildung 3.10 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten HC Domänen	84
Abbildung 3.11 Sequenzvergleich der in myxobakteriellen NRPSs gefundenen Ox Domänen	85
Abbildung 3.12 Analyse der MOX Domäne von MtaG	86
Abbildung 3.13 Analyse der TE Domäne	86
Abbildung 3.14 Allgemeines Mutagenese-Schema zur Erzeugung von markerlosen Mutationen und Deletionen unter Erhalt des Leserahmens	89
Abbildung 3.15 Die Klonierungsstrategien der erzeugten Mutageneseplasmide	90
Abbildung 3.16 Die Punktmutationen innerhalb der vermuteten ER Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB	92
Abbildung 3.17 (A) Thiazolin-Thiazol Derivat des Myxothiazols; (B) Bisthiazolin Derivat des Myxothiazols; (C) Myxothiazol Derivat mit regulärer Lage der Doppelbindungen	93
Abbildung 3.18 Die Punktmutationen innerhalb der KR Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB	94
Abbildung 3.19 10-Ketoderivat des Myxothiazols	95
Abbildung 3.20 Strategie zur Deletion der Ox Domäne von MtaC	97
Abbildung 3.21 Thiazolin-Thiazol-Derivat des Myxothiazols	97
Abbildung 3.22 Deletion der Oxidationsdomäne von MtaC	99
Abbildung 3.23 PCR-Analyse der nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Mutanten	100
Abbildung 3.24 HPLC Analyse der Extrakte von <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1, der Mutante ESW400 und der Mutante ESW392	101
Abbildung 3.25 Thiazol-Thiazolin-Derivat des Myxothiazols	102
Abbildung 3.26 SDS PAGE Gel der gereinigten OX Domäne von MtaC	104
Abbildung 3.27 UV Spektrum des Cofaktors der Ox Domäne von MtaC	105
Abbildung 3.28 (A) Thiazolin-Thiazol-Myxothiazol; (B) Melithiazol K; (C) Melithiazol L	106
Abbildung 3.29 Die Punktmutationen innerhalb der O-MT Domäne von MtaE	108
Abbildung 3.30 18-Desmethyl-Myxothiazol	108
Abbildung 3.31 Die Punktmutationen innerhalb der O-MT Domäne von MtaF	109
Abbildung 3.32 20-Desmethyl-Myxothiazol	109
Abbildung 3.33 Durch Hydrolyse und Decarboxylierung möglicherweise entstehendes Methylketon	111
Abbildung 3.34 Die für die Deletion der MOX Domäne von MtaG erwarteten Myxothiazolderivate	112
Abbildung 3.35 (A) Myxothiazol mit der tatsächlichen ("irregulären") Lage der Doppelbindungen innerhalb der Nonadienylseitenkette. (B) Myxothiazolderivat, bei dem sich die Doppelbindungen in der für Polyketide üblichen ("regulären") Lage befinden	113
Abbildung 3.36 Die Nonadienylseitenkette mit "regulärer" und "irregulärer" Lage der Doppelbindungen im Vergleich	115
Abbildung 3.37 Insertionsinaktivierung durch einfache homologe Rekombination	116
Abbildung 3.38 Strategie zum Auffinden des Isogens von <i>mtaH</i>	118

Abbildung 3.39 Die Genanordnung des <i>mta</i> und des <i>mel</i> Genclusters im Vergleich	121
Abbildung 3.40. Sequenzvergleich von MelK mit weiteren Methyltransferasen ohne typische SAM-Bindestelle	125
Abbildung 3.41 Die katalytische Triade von MelJ	126
Abbildung 3.42 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten KS Domänen	130
Abbildung 3.43 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten AT Domänen	131
Abbildung 3.44 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten KR Domänen	131
Abbildung 3.45 Analyse der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten DH Domäne	132
Abbildung 3.46 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten O-MT Domänen	132
Abbildung 3.47 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten ACP und PCP Domänen	133
Abbildung 3.48 Analyse der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten C Domäne	133
Abbildung 3.49 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten A Domänen	134
Abbildung 3.50 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten HC Domänen	135
Abbildung 3.51 Sequenzvergleich der potentiellen Oxidationsdomänen der MELS	136
Abbildung 3.52 Analyse der MOX Domäne von MelG	136
Abbildung 3.53 Analyse der Thioesterase Domäne	137
Abbildung 3.54 Myxothiazolderivat mit verkürzter Seitenkette	140
Abbildung 3.55 Heterologe Expression von MelB in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	141
Abbildung 3.56 Sequenzvergleich von MelD und MtaD im N-terminalen Bereich der inserierten Ox Domänen	143
Abbildung 3.57 Mutagenese-Schema zur Substitution der Adenylierungsdomäne in MtaD durch die Adenylierungsdomäne aus MelD	144
Abbildung 3.58 Klonierungsstrategie zur Erzeugung von pESW241	146
Abbildung 3.59 Schematische Darstellung der verschiedenen Genotypen von ESW609 und ESW601	147
Abbildung 3.60 Vergleich der Myxothiazole A und Z	148
Abbildung 3.61 Klonierungsstrategie zur Erzeugung von pESW243	150
Abbildung 3.62 Heterologe Expression von MelK und MelJ in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	151
Abbildung 3.63 HPLC Analyse der Extrakte von <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1, der Mutante ESW602 und <i>M. fulvus</i> Mx f 333/8.	153
Abbildung 3.64 Konstruktion von Plasmid pMSW20	155
Abbildung 3.65 Massenspektrum des isolierten Melithiazols nach Fütterung von D8-DL-Valin	156
Abbildung 3.66 <sup>13</sup> C-NMR Spektrum des isolierten Melithiazols nach Fütterung von [ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-Methionin	157
Abbildung 4.1 Phylogenetischer Vergleich der O-MT Domänen des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters, des Melithiazol-Biosynthesegenclusters und des Stigmatellin-Biosynthesegenclusters	165
Abbildung 4.2 (A) Die Bildung amidierter Peptide in Insekten und Säugetieren (B) Die postulierte Entstehung des Säureamides im Myxothiazol	167
Abbildung 4.3 Sequenzvergleich der Spacer Regionen	170
Abbildung 4.4 Sequenzvergleich von MtaG mit bakteriellen Luciferasen	175
Abbildung 4.5 Modell der Melithiazolbiosynthese	185
Abbildung 4.6 Modell für die Bildung eines Methylesters aus einem Säureamid	190
Abbildung 4.7 Phylogenetischer Vergleich der KS Domänen des <i>mta</i> und des <i>mel</i> Clusters	193
Abbildung 4.8 Phylogenetischer Vergleich der AT Domänen des <i>mta</i> und des <i>mel</i> Clusters	194
Abbildung 4.9 Hypothese zur Entstehung von MelB und MtaB	195
Abbildung 4.10 Phylogenetischer Vergleich der KR Domänen des <i>mta</i> und des <i>mel</i> Clusters	195
Abbildung 4.11 Phylogenetischer Vergleich der DH Domänen	196
Abbildung 4.12 Sequentieller Vergleich myxobakterieller Ox Domänen	197
Abbildung 4.13 Phylogenetischer Vergleich der HC Domänen des <i>mta</i> und des <i>mel</i> Clusters	198

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1 Vergleich der minimalen Ausstattung von PKS und NRPS Modulen	9
Tabelle 2.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen	16
Tabelle 2.2 Bezugsquellen der verwendeten Enzyme, "Kits" und Nukleinsäuren	18
Tabelle 2.3 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	20
Tabelle 2.4 Stammlösungen der verwendeten Antibiotika	22
Tabelle 2.5 Puffer und Lösungen für Hybridisierungsexperimente mit Hilfe des DIG-Systems	23
Tabelle 2.6 Puffer und Lösungen für die Extraktion und Reinigung von Intein-Chitin-Fusionsproteinen	25
Tabelle 2.7 Puffer und Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
Tabelle 2.8 Lösungen zur Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	26
Tabelle 2.9 Puffer und Lösungen zum Anlegen einer Cosmidgenbank	27
Tabelle 2.10 Herstellung von Medien	28
Tabelle 2.11 Besondere Geräte/Materialien	29
Tabelle 2.12 Auflistung der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme	31
Tabelle 2.13 Auflistung der verwendeten Myxobakterien	32
Tabelle 2.14 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutanten	32
Tabelle 2.15 Auflistung der verwendeten Plasmide	33
Tabelle 2.16 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide	34
Tabelle 2.17 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide	37
Tabelle 2.18 Protokoll zur Detektion der Proteinbanden	65
Tabelle 2.19 Trennsystem 1 für die HPLC Analyse	66
Tabelle 2.20 Trennsystem 2 für die HPLC Analyse	66
Tabelle 2.21 Trennsystem 3 für die HPLC Analyse	66
Tabelle 2.22 Trennsystem für die HPLC Analyse mit massenselektiver Detektion	67
Tabelle 3.1 Die abgeleiteten Funktionen der für die Myxothiazolbiosynthese verantwortlichen Proteine	75
Tabelle 3.2 Die spezifitätsbestimmenden Aminosäuren der A Domänen der MTAS	83
Tabelle 3.3 Die stromabwärts des <i>mta</i> Clusters lokalisierten Leserahmen	87
Tabelle 3.4 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutageneseplasmide	91
Tabelle 3.5 Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Reaktion	106
Tabelle 3.6 Zusammensetzung der verwendeten Puffer	107
Tabelle 3.7 Die zur Charakterisierung der Myxothiazolbiosynthese durchgeführten Mutagenesen	119
Tabelle 3.8 Die abgeleiteten Funktionen der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten Gene.	127
Tabelle 3.9 Die abgeleiteten Funktionen der stromaufwärts und stromabwärts des <i>mel</i> Genclusters gelegenen offenen Leserahmen	128
Tabelle 3.10 Die spezifitätsbestimmenden Aminosäuren der A Domänen der MELS	135
Tabelle 3.11 Vergleich des <i>mta</i> und <i>mel</i> Biosynthesegenclusters	158
Tabelle 3.12 Vergleich der spezifitätsbestimmenden Aminosäuren der A Domänen der MTAS und der MELS	159

**Abkürzungsverzeichnis**

A Domäne	Adenylierungsdomäne
ACP Domäne	Acyl Carrier Protein Domäne
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT Domäne	Acyltransferase Domäne
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
ca.	circa
C Domäne	Kondensationsdomäne
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine alkaline phosphatase)
C-MT	C-Methyltransferase
CoA	Coenzym A
d	desoxy
D	Deuterium (schwerer Wasserstoff)
Da	Dalton
DAD-HPLC	Dioden Array Detection gekoppelte HPLC
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DH Domäne	$\beta$ -Hydroxy-Dehydratase Domäne
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ER Domäne	Enoylreduktase Domäne
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
Fe	Eisen
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
h	Stunde
HC Domäne	Heterozyklisierungsdomäne
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaare
KR Domäne	$\beta$ -Ketoacylreduktase Domäne
KS Domäne	$\beta$ -Ketoacylsynthase Domäne
l	Liter
<i>lacI</i>	<i>lac</i> -Repressorgen

<i>lacZ'</i>	$\beta$ -Galaktosidasegen
LB-Medium	Luria Bertani Medium
m	milli
M	Molar
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionisation
MELS	Melithiazolsynthetase
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOX Domäne	Monooxygenase Domäne
ms	Millisekunde
MTAS	Myxothiazolsynthetase
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NRPSs	Nichtribosomale Peptidsynthetasen
OD <sub>xxx</sub>	optische Dichte bei xxx nm
O-MT Domäne	O-Methyltransferase Domäne
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ORFs	offene Leserahmen (open reading frames)
Ox Domäne	Oxidationsdomäne
p.A.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP Domäne	Peptidyl Carrier Protein Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
PKSs	Polyketidsynthasen
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat (anorganisches Diphosphat)
PpT	Phosphopantetheinyltransferase
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Spacer Region
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAP	alkalische Shrimp Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/HCl-EDTA
TE Domäne	Thioesterasedomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	Flugzeitanalysator (Time of flight)
U	Enzymeinheit (Unit)
V	Volt
VT	Volumenteile
(v/v)	Volumen pro Volumen

(w/v)	Gewicht pro Volumen
(w/w)	Gewicht pro Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-Galaktosid
°C	Grad Celsius
$\mu$	mikro

## Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	1-Buchstabencode	3-Buchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

# 1 Einleitung

## 1.1 Mikroorganismen als Naturstoff-Produzenten

Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, biologisch aktive Substanzen, sogenannte Sekundärmetabolite, zu produzieren (Strohl, 1997). Zahlreiche Vertreter werden pharmakologisch genutzt (siehe Abbildung 1.1). Erythromycin und Rifamycin werden als Antibiotika eingesetzt. Rapamycin und Cyclosporin wirken immunsuppressiv. Bleomycin und Daunorubicin sind stark wirksame Zytostatika. Zu den mikrobiellen Naturstoffen zählen aber auch Eisenchelatoren wie Yersiniabactin und Mycobactin. Solche Siderophore werden unter Eisenmangelbedingungen gebildet und von der Zelle ausgeschieden. Extrazellulär komplexieren sie  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Ionen und werden beladen wieder in die Zelle aufgenommen. Durch diese Art der Eisenversorgung tragen sie zur Virulenz des Produzentenorganismus bei.

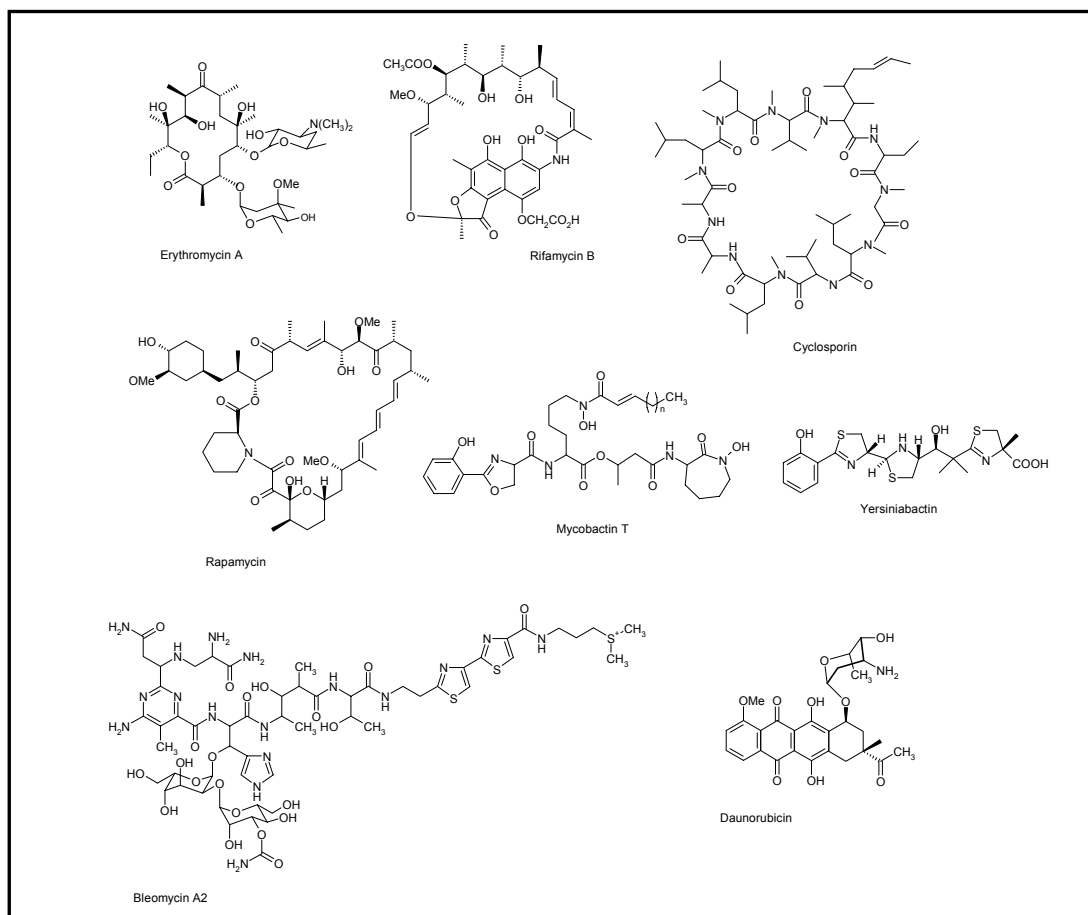


Abbildung 1.1 Beispiele für mikrobielle Sekundärmetabolite mit pharmakologischer Bedeutung

Etwa 66 % der bekannten mikrobiellen Naturstoffe werden von Actinomyceten gebildet. Ungefähr 12 % stammen aus Nicht-Actinomyceten wie z.B. den Gattungen *Bacillus* und *Pseudomonas*. 20 % werden von Eukaryonten, hauptsächlich filamentösen Pilzen gebildet (Demain, 1999). Eine weitere Quelle bakterieller Sekundärmetabolite sind Cyanobakterien (Namikoshi & Rinehart, 1996; Weckesser *et al.*, 1996). Das Spektrum der Produzentenorganismen wird durch die Gruppe der Myxobakterien erweitert. In einem seit 1977 andauernden „Naturstoff-Screening“ konnten aus dieser Organismengruppe an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) mehr als 100 Grundstrukturen mit über 500 Derivaten isoliert werden. Etwa zwei Drittel der gefundenen Grundstrukturen waren neuartig (Höfle & Reichenbach, 1995; Reichenbach & Höfle, 1993; Reichenbach & Höfle, 1999).

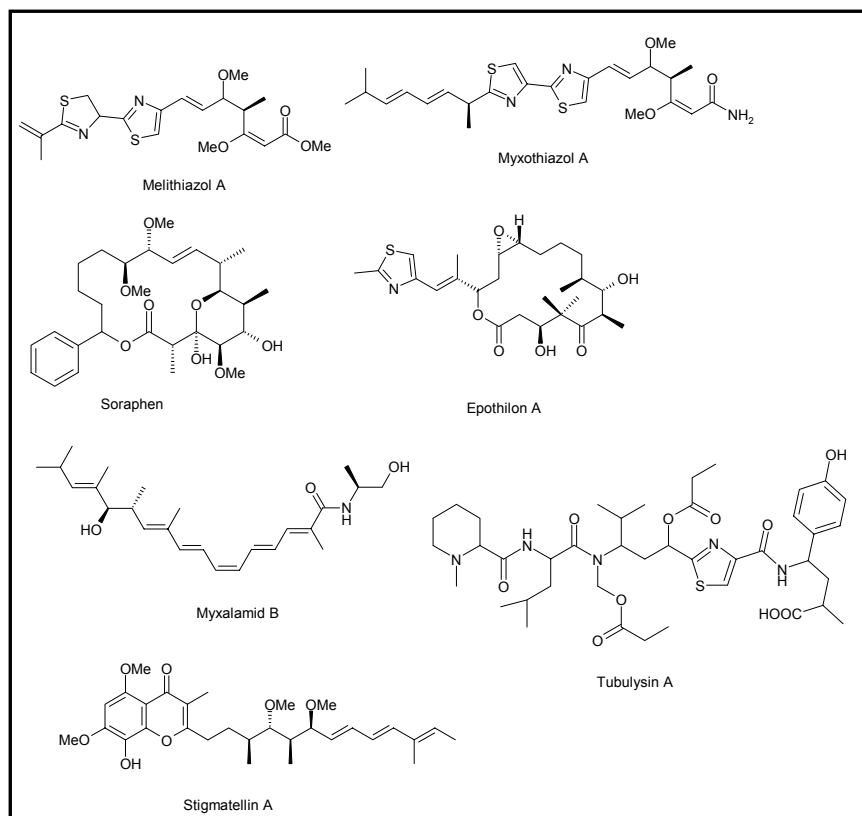


Abbildung 1.2 Übersicht myxobakterieller Sekundärmetabolite

Die myxobakteriellen Naturstoffe gehören den verschiedensten chemischen Verbindungsklassen an. So wurden Polyether, Polyene, Makrolide, Peptide, Peptolide, Terpene, Steroide etc. identifiziert. Mit der enormen strukturellen Variabilität geht eine Vielzahl von (teilweise seltenen) Wirkmechanismen einher. So hemmt beispielsweise Soraphen die pilzliche Acetyl-CoA-Carboxylase (Vahlensieck



*et al.*, 1994). Sorangicin blockiert die eubakterielle RNA-Polymerase (Irschik *et al.*, 1987). Ungewöhnlich viele myxobakterielle Sekundärmetabolite hemmen effizient die Atmungskette. Myxothiazol (Thierbach & Reichenbach, 1981), Melithiazol (Sasse *et al.*, 1999), Stigmatellin (Kunze *et al.*, 1984) und die Aurachine C und D (Kunze *et al.*, 1987) blockieren den Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex. Im Gegensatz dazu inhibiert Myxalamid (Gerth *et al.*, 1983) die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase. Den Atmungsketteninhibitoren gemein ist ihre antifungische und insektizide Wirkung. So zeigten beispielsweise diverse Melithiazolderivate in Feldstudien eine sehr gute Wirkung als Agrofungizide (Prof. Höfle, persönliche Mitteilung). Allerdings waren die Melithiazole für eine praktische Anwendung zu teuer. Die gegenüber Säugetieren hohe Toxizität verhinderte bislang eine therapeutische Nutzung. Aus Myxobakterien konnte außerdem eine Reihe von Substanzen isoliert werden, die mit dem Zytoskelett eukaryontischer Zellen interagieren. So stabilisiert das aus *Sorangium cellulosum* So ce90 isolierte Epothilon die Mikrotubuli (Bollag *et al.*, 1995). Dies führt zur Stagnation des Zellzyklus und letztlich zum Zelltod (Apoptose). Im Gegensatz dazu destabilisiert Tubulysin (Sasse *et al.*, 2000) die Mikrotubuli und löst das Zytoskelett innerhalb weniger Stunden auf.

## 1.2 Allgemeine Beschreibung der Myxobakterien

Die Ordnung *Myxococcales*, die ihrerseits aus den Unterordnungen *Cystobacterineae* und *Sorangineae* besteht, gehört in die  $\delta$ -Gruppe der Proteobakterien. Myxobakterien sind obligat aerobe, chemotrophe, Gram-negative Bodenbakterien. Die stäbchenförmigen Zellen sind etwa 3-12  $\mu\text{m}$  lang und 0,7-1,2  $\mu\text{m}$  breit.

Neben ihrer Fähigkeit, sich durch Gleiten auf festen Oberflächen fortzubewegen, zeichnen sich Myxobakterien durch ein ausgeprägtes „soziales Verhalten“ aus. So induziert beispielsweise Nährstoffmangel die Bildung von sogenannten Fruchtkörpern. Das sind komplexe Strukturen, die aus bis zu  $10^9$  Zellen bestehen können. Ein Teil der Zellen differenziert sich darin zu Myxosporen (Reichenbach, 1986). Diese ruhenden Zellen keimen unter günstigen Nahrungsbedingungen aus und bringen vegetative Zellen hervor. Die Fruchtkörper der Myxobakterien variieren von haufenförmigen Gebilden aus lockerem Schleim mit eingebetteten Myxosporen

bis hin zu komplexen Fruchtkörpern mit einer bäumchenartigen Struktur (Reichenbach, 1984; Reichenbach, 1986). Bei letzteren trägt ein Stiel eine (*Stigmatella erecta*) oder mehrere Sporangiolen (*Stigmatella aurantiaca*). Hierin befinden sich Myxosporen, die so durch eine widerstandsfähige Schale geschützt sind.

Es lassen sich bakteriolytische und cellulolytische Myxobakterienarten unterscheiden. Die erste – weitaus größere – Gruppe besitzt die Fähigkeit, die Zellen anderer Bakterien und Hefen durch das Ausscheiden von Exoenzymen zu lysieren. Wenige Spezies, die alle der Gattung *Sorangium* angehören, sind in der Lage, Cellulose abzubauen, um ihren Kohlenstoffbedarf zu decken (Reichenbach, 1984).

Ein weiteres Charakteristikum der Myxobakterien sind ihre bis zu 12 Mbp großen Genome, die zu den größten bekannten bakteriellen Genomen zählen (Chen *et al.*, 1990; Neumann *et al.*, 1992; Pradella *et al.*, 2002). Hinsichtlich der Basenzusammensetzung ihrer DNA ist der hohe GC-Gehalt typisch, der zwischen 66-72% schwankt (Mandel & Leadbetter, 1965; McCurdy & Wolf, 1967). Außerdem sind in dieser Organismengruppe noch keine replizierenden Plasmide identifiziert worden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 und *Melittangium lichenicola* Me 146 gehören in die Unterordnung der *Cystobacterineae*.

### **1.3 Biosynthese bakterieller Naturstoffe durch Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen**

#### **1.3.1 Funktionsweise von Polyketidsynthasen**

Bei einem Großteil der mikrobiellen Naturstoffe handelt es sich um niedermolekulare Polyketide und Polypeptide. Diese werden von Polyketidsynthasen (PKSs) bzw. nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs) gebildet. Basierend auf dem Katalysemechanismus und dem Proteinaufbau lassen sich Polyketidsynthasen in die Typen I bis III unterteilen, wobei beim Typ I pilzliche und bakterielle PKS unterschieden werden.

Bakterielle Polyketidsynthasen vom Typ I sind große multifunktionelle Proteine, die modular aufgebaut sind (Hopwood, 1997; Staunton & Weissman, 2001). Ein Modul

ist als die funktionale Einheit definiert, die für die Inkorporation eines Monomers in die wachsende Kette und deren Modifikation nötig ist. Die biogenetischen Bausteine, die das finale Produkt bilden, werden aus dem zellulären Pool ausgewählt, kovalent an spezifische Enzymabschnitte gebunden (siehe unten) und dann sukzessive verknüpft. Jedes Modul wird während der Kettenverlängerung meist nur einmal benutzt und reicht das entsprechende Intermediat an das nachfolgende Modul weiter. Daraus resultiert die Kolinearität von Proteinmatrize und Produkt. Nach Einbau des letzten Monomers wird das lineare Intermediat durch Hydrolyse oder Zyklisierung vom Protein abgelöst. Diese Abspaltung wird von sogenannten Thioesterase (TE) Domänen katalysiert. Domänen sind die Untereinheiten eines Moduls, die während der Elongation und Modifikation die jeweiligen Teilschritte katalysieren.

Das Weiterreichen der wachsenden Intermediate von Modul zu Modul bewerkstelligen Acyl Carrier Protein (ACP) Domänen und Peptidyl Carrier Protein (PCP) Domänen (siehe 1.3.2). Dieser Domärentyp muss vor dem Start der Biosynthese posttranslational aktiviert werden (siehe Abbildung 1.3). Dazu wird der aus Coenzym A stammende Phosphopantetheinrest von sogenannten Phosphopantetheinyltransferasen auf einen hochkonservierten Serinrest übertragen (Lambalot *et al.*, 1996). An die Sulfhydrylgruppe des Phosphopantetheinarmes werden die Kettenverlängerungseinheiten als Thioester gebunden. In der Modellvorstellung fungiert der Phosphopantetheinrest als schwingender Arm, der die Intermediate zum nächsten Modul weiterreicht.

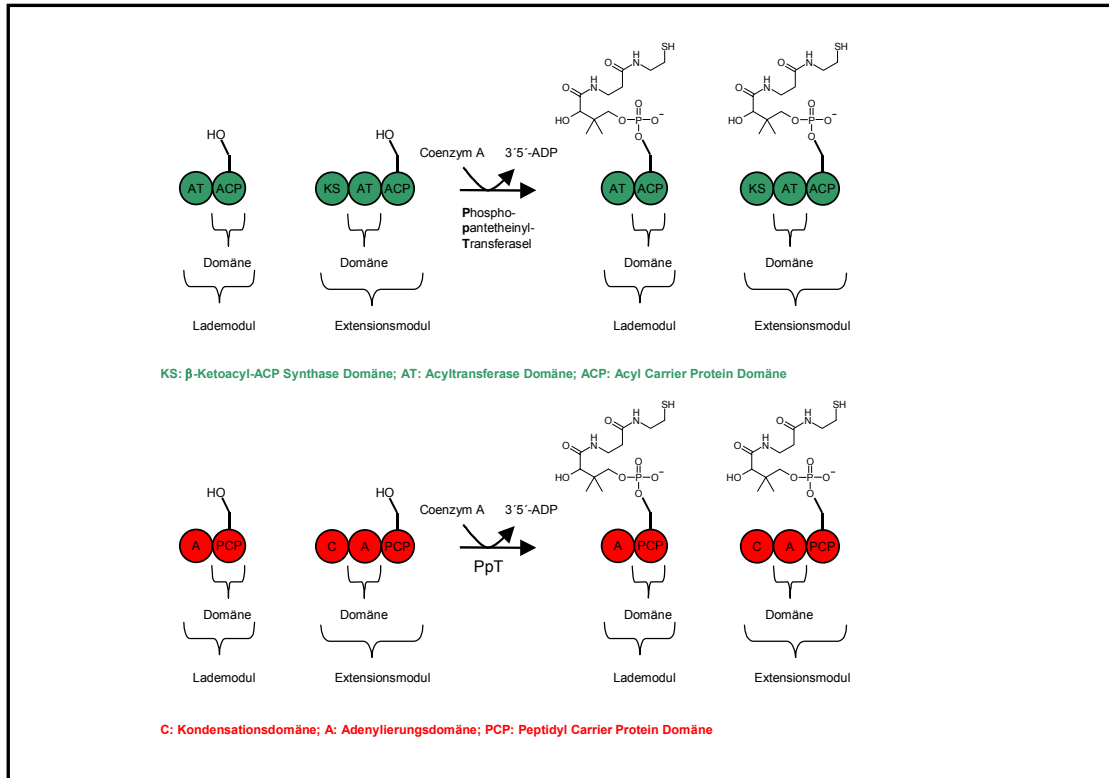


Abbildung 1.3 Aktivierung von Acyl Carrier Proteinen und Peptidyl Carrier Proteinen.

Zu Beginn der Polyketidbiosynthese wählt die Acyltransferase (AT) Domäne des Lademoduls den Coenzym A-Thioester einer kurzkettigen Carbonsäure (meist Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA) als Startereinheit aus und überträgt die Säure auf den Phosphopantetheinarm der nachfolgenden ACP Domäne (siehe Abbildung 1.4). Analog belädt die Acyltransferase Domäne des ersten Extensionsmoduls das entsprechende ACP mit Malonyl- oder Methylmalonyl-CoA. Die Elongation erfolgt in zwei Schritten: Über einen nukleophilen Angriff wird die Startereinheit auf ein hochkonserviertes Cystein der  $\beta$ -Ketoacylsynthase (KS) Domäne übertragen. Anschließend katalysiert diese die Decarboxylierung der als Thioester gebundenen  $\alpha$ -Dicarbonsäure, wobei ein Carbanion entsteht, das die Startereinheit nukleophil angreift. Das daraus resultierende Diketid fungiert im nächsten Schritt der Kettenverlängerung für das nächste Modul als Donor. Diese Abfolge von Reaktionsschritten wird wiederholt, bis die vollständige Kettenlänge erreicht ist und die TE Domäne die Abspaltung des Produktes katalysiert.

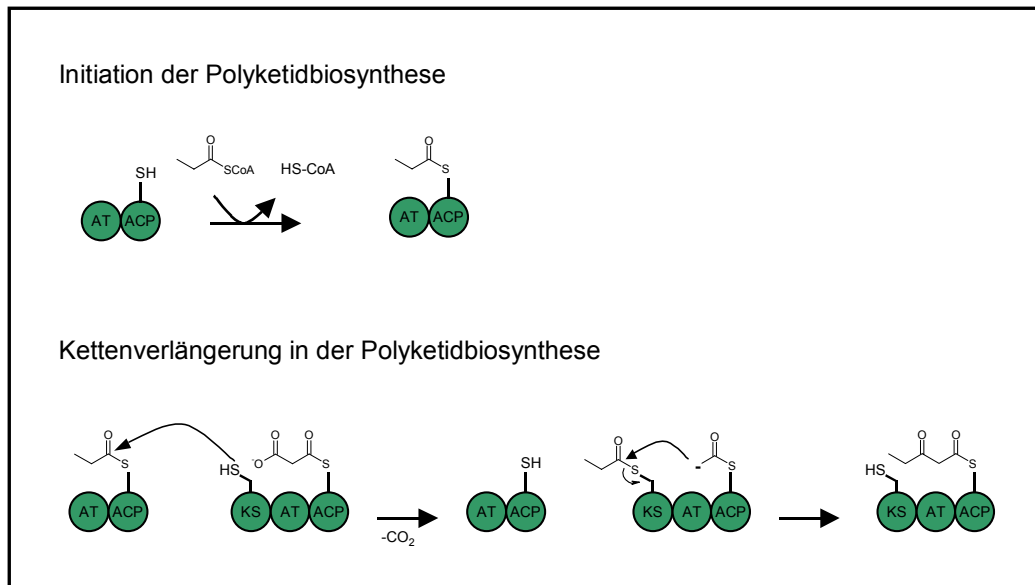


Abbildung 1.4 Ablauf der Polyketidbiosynthese.

KS, AT und ACP Domäne gehören zur minimalen Ausstattung eines Moduls. Diese sind für die Inkorporation eines Monomers in die wachsende Polyketidkette unentbehrlich. Es existiert aber auch eine Reihe optionaler Domänen, die den  $\beta$ -Carbonylkohlenstoff modifizieren (siehe Abbildung 1.5). So kann dieser von einer NADPH-abhängigen  $\beta$ -Ketoacylreduktase (KR) Domäne zum sekundären Alkohol reduziert werden. Die von Dehydratase (DH) Domänen katalysierte Wasserabspaltung macht dessen Umwandlung zum Enoyl möglich. Das resultierende Olefin kann von einer NADPH-abhängigen Enoylreduktase (ER) Domäne zum Alkan reduziert werden (Hopwood, 1997). Die optionalen Domänen bilden im Protein eine sogenannte reduktive Schleife (Staunton & Weissman, 2001). Im Unterschied zur Fettsäurebiosynthese, in deren Verlauf immer bis zur gesättigten Verbindung reduziert wird, sind bei Polyketiden alle Reduktionsstufen anzutreffen (Hopwood, 1997).

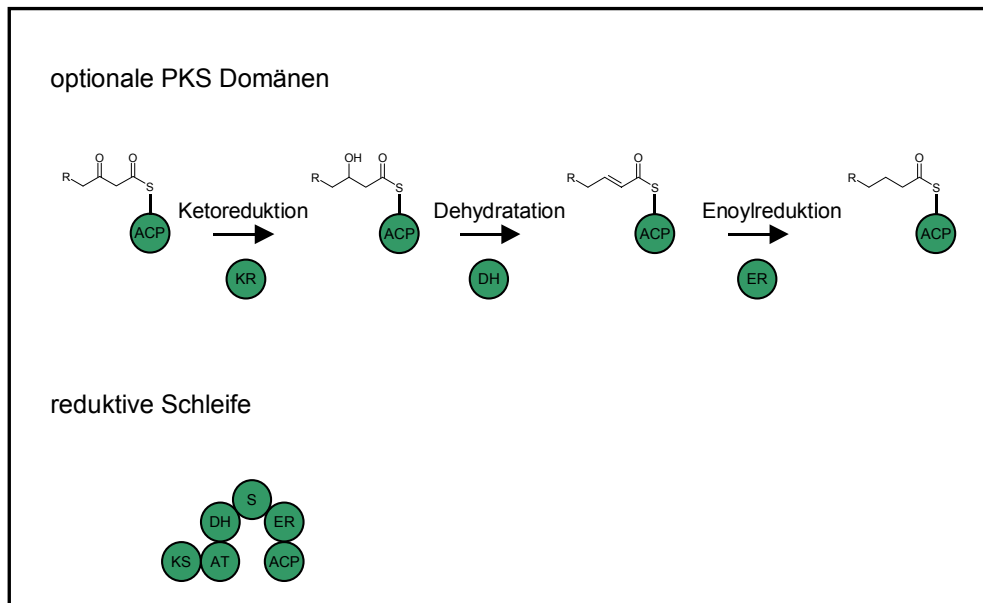


Abbildung 1.5 Die optionalen Domänen von Polyketidsynthasen

Neben den bakteriellen Polyketidsynthasen vom Typ I existieren auch pilzliche Polyketidsynthasen vom Typ I (Fujii, 1999). Diese sind ebenfalls modular aufgebaut, allerdings werden die Module hier iterativ genutzt. So sind beispielsweise für die Biosynthese des als Lipidsenker verwendeten Lovastatins aus *Aspergillus terreus* Enzyme dieses Typs verantwortlich (Hendrickson *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1999). Polyketidsynthasen vom Typ II bilden Multienzym-Komplexe aus monofunktionellen Proteinen (Hopwood, 1997). Hier katalysieren diskrete, iterativ genutzte Proteine die Teilreaktionen der Kettenverlängerung und Kettenmodifikation. Es dient ausschließlich Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit. Im Unterschied zu den Polyketidsynthasen von Typ I wird kein Reduktionsschritt durchgeführt. Aus den Poly- $\beta$ -ketosäuren unterschiedlicher Kettenlänge entstehen über Zyklisierungen und Enolisierungen aromatische Polyketide. Als Beispiele seien hier sowohl die Zytostatika Daunorubicin und Doxorubicin als auch das antibiotisch wirksame Tetracenomycin genannt (Hopwood, 1997).

Bakterielle Polyketidsynthasen vom Typ III ähneln pflanzlichen Chalkonsynthasen (Funa *et al.*, 1999; Moore & Hopke, 2001). Von dieser Enzymklasse werden ebenfalls CoA-Einheiten durch decarboxylative Kondensation verknüpft (Ferrer *et al.*, 1999). Allerdings dienen hier keine an den Phosphopantetheinarm gebundene Intermediate, sondern freie CoA-Ester als Substrate.

### 1.3.2 Funktionsweise von nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind große multifunktionelle Proteine, die bei der Bildung von Naturstoffen eine ähnliche biosynthetische Strategie verfolgen wie die Polyketidsynthetasen vom Typ I (Cane & Walsh, 1999; Keating & Walsh, 1999). Die Vertreter beider Enzymklassen sind modular aufgebaut. Im Gegensatz zu PKS dienen NRPS jedoch Aminosäuren (proteinogene und nicht proteinogene) als Substrate.

Tabelle 1.1 Vergleich der minimalen Ausstattung von PKS und NRPS Modulen

	PKS	NRPS
Erkennung/Aktivierung Beladung der Carrier Domänen	Acyltransferase Domäne	Adenylierungsdomäne
Verknüpfung der Monomere	$\beta$ -Ketoacylsynthase Domäne	Kondensationsdomäne
Weiterreichen der Intermediate	Acyl Carrier Protein Domäne	Peptidyl Carrier Protein Domäne

Zur Minimalausstattung eines Verlängerungsmoduls gehören eine Adenylierungs (A) Domäne, eine Kondensations (C) Domäne und eine Peptidyl Carrier Protein (PCP) Domäne (Marahiel *et al.*, 1997). Im Unterschied dazu bestehen Lademodule lediglich aus einer A und PCP Domäne (siehe Abbildung 1.6). Die A Domäne eines jeden Moduls aktiviert die ihrer Substratspezifität entsprechende Aminosäure in einer ATP-abhängigen Reaktion zum Aminoacyladenylat und überträgt dieses auf das nachfolgende PCP (siehe Abbildung 1.6). Die Substratspezifität der A Domänen wird von acht nicht konservierten Aminosäuren innerhalb der hydrophoben Bindetasche bestimmt (Conti *et al.*, 1997). Durch den Vergleich dieser Reste von ungefähr 150 A Domänen wurde der Spezifitätskode der A Domänen entschlüsselt (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). Die C Domäne katalysiert den nukleophilen Angriff der Aminogruppe eines Aminoacylrestes auf den Carbonylkohlenstoff des am vorgelagerten Modul gebundenen Peptidyl- bzw. Aminoacylrestes (siehe Abbildung 1.6). Dabei entsteht eine Peptidbindung. In Analogie zur PKS wird dieser Prozess wiederholt, bis das Polypeptid am letzten Modul seine volle Länge erreicht hat und von der TE Domäne als lineares oder cyclisches Produkt vom Protein abgespalten wird (Marahiel *et al.*, 1997).

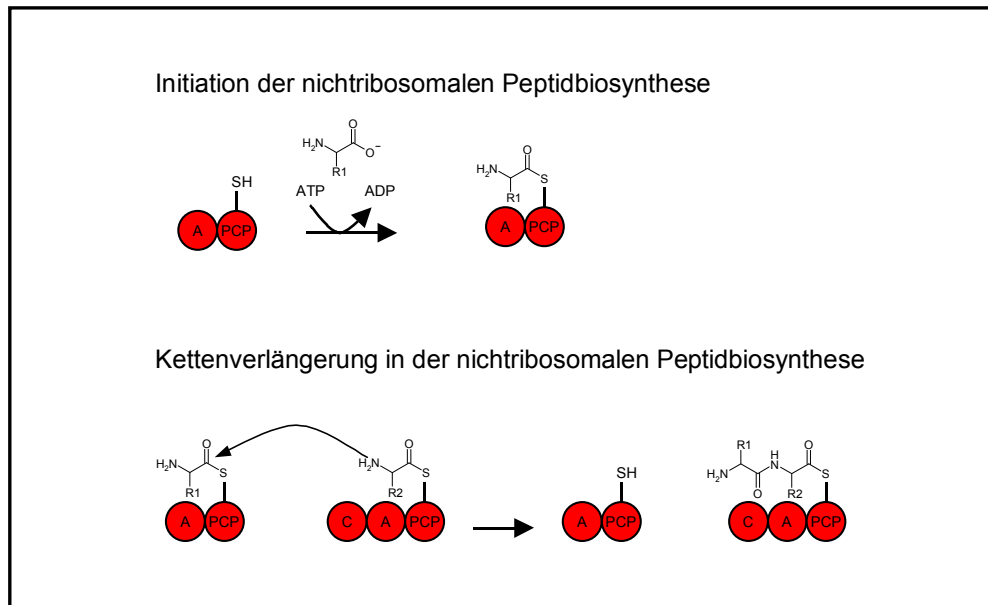


Abbildung 1.6 Ablauf der nichtribosomalen Peptidbiosynthese

Zur strukturellen Vielfalt der nichtribosomal gebildeten Peptide tragen optionale Epimerisierungs (E)-, N-Methylierungs (N-MT)- und Heterozyklisierungs (HC) Domänen bei (siehe Abbildung 1.7, (Konz *et al.*, 1997; Marahiel *et al.*, 1997)). E Domänen lagern die zuletzt in die Kette inkorporierte L-Aminosäure in ihre D-Form um. In einer S-Adenosyl-Methionin abhängigen Reaktion katalysieren N-MT Domänen die Methylierung der  $\alpha$ -Aminogruppe der als Thioester aktivierten Aminosäure. So sind beispielsweise in sieben der insgesamt elf Module der Cyclosporinsynthetase N-MT Domänen eingebettet (von Dohren *et al.*, 1997). HC Domänen können als spezialisierte Variante der C Domänen angesehen werden. Aminosäuren wie Cystein, Serin und Threonin verfügen zusätzlich zu der  $\alpha$ -Aminogruppe über ein weiteres Nukleophil. Nach deren Inkorporation katalysieren HC Domänen eine Zyklisierungs-/Dehydratisierungsreaktion (siehe Abbildung 1.7). Dabei greift die Sulfhydrylgruppe im Falle von Cystein bzw. die Hydroxylgruppe im Falle von Serin oder Threonin den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung nukleophil an, wobei unter Wasserabspaltung ein Thiazolin- (nach Cystein-Einbau) oder ein Oxazolinring (nach Serin- bzw. Threonin-Einbau) entsteht.



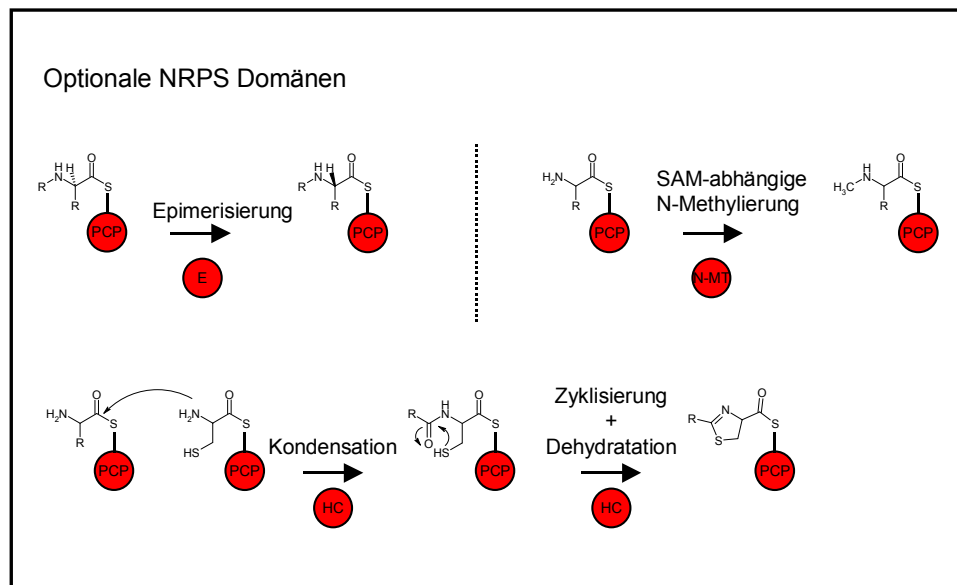


Abbildung 1.7 Die optionalen Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen

Die für Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen kodierenden Gene sind in sogenannten Clustern angeordnet. Ein Gencluster ist eine Abfolge von Genen, deren Enzyme an einer gemeinsamen Biosyntheseleistung (hier Bildung von Sekundärmetaboliten) beteiligt sind. Häufig unterliegen die Gene eines Clusters einer gemeinsamen Regulation.

Es ist als Besonderheit hervorzuheben, dass die Biosynthese vieler myxobakterieller Sekundärmetabolite durch eine Mischung von Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen bewerkstelligt wird. Das Verständnis der Biosynthesen solcher Hybride aus Polyketiden und nichtribosomal gebildeten Peptiden und die Manipulation der Gene ist eine Möglichkeit, neue Sekundärmetabolite mit verbesserten physikochemischen bzw. pharmakologischen Eigenschaften zu erzeugen.

#### 1.4 Die Atmungsketteninhibitoren Myxothiazol und Melithiazol

Das antifungisch wirkende Myxothiazol A wurde 1980 aus *Myxococcus fulvus* Mx f16 isoliert (Gerth *et al.*, 1980). Es war das erste myxobakterielle Antibiotikum, das an der GBF entdeckt wurde, und nach Ambruticin (Ringel *et al.*, 1977) der zweite aus diesen Organismen gewonnene Sekundärmetabolit, dessen Struktur aufgeklärt wurde (Trowitzsch *et al.*, 1980).

Myxothiazol A gehört in die Gruppe der  $\beta$ -Methoxyacrylate (ungeachtet der Tatsache, dass ein Acrylamid statt eines Acrylesters vorliegt). Becker und Mitarbeiter zeigten 1981, dass dieser Pharmacophor für die Hemmung des  $bc_1$ -Komplexes der Atmungskette verantwortlich ist (Becker *et al.*, 1981). Die Enzyme der Atmungskette sind in eukaryontischen Zellen an die Innenseite der Mitochondrienmembran gebunden. Sie transportieren, angetrieben vom Elektronenfluss in der Membran, Protonen von deren Innenseite zur Außenseite, woraus ein Ladungsungleichgewicht resultiert. Dieser elektrochemische Gradient wird letztlich für die Synthese von ATP durch Phosphorylierung von ADP genutzt. Die Bindung von Myxothiazol A an den  $bc_1$ -Komplex unterbricht den Elektronenfluss. Mit dem Zusammenbrechen des Protonengradienten kommt die ATP-Bildung zum Erliegen (Kim *et al.*, 1998).

Fütterungsversuche mit markierten Vorstufen zeigten, dass Myxothiazol aus drei Acetat-, zwei Propionateinheiten, zwei Cysteinresten und einer von Leucin abgeleiteten 3-Methylbuttersäure-Startereinheit aufgebaut wird. Die beiden Methoxygruppen konnten durch Fütterung von [ $^{13}\text{C}$ ]-Methionin markiert werden, was auf eine SAM-abhängige Methylierung schließen ließ (Trowitzsch-Kienast *et al.*, 1986). Aufgrund dieser biogenetischen Bausteine wurde spekuliert, dass ein Stoffwechselweg, der sowohl Carbonsäuren als auch Aminosäuren verknüpft, für die Bildung der Substanz verantwortlich ist (Reichenbach & Höfle, 1993).

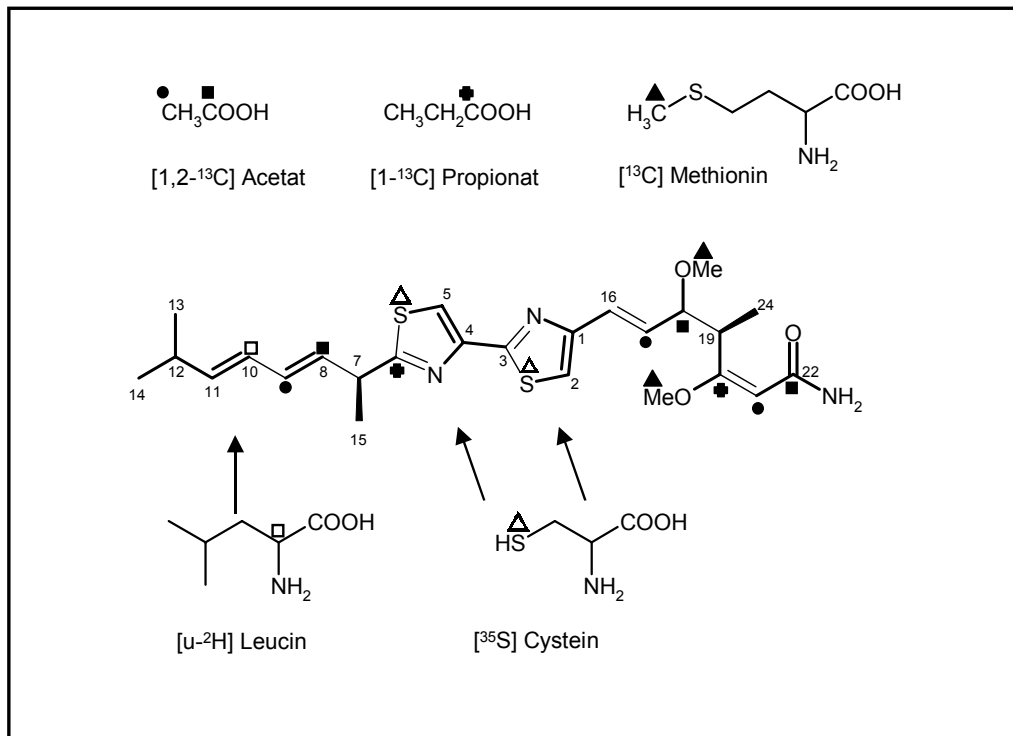


Abbildung 1.8 Die biogenetischen Bausteine des Myxothiazols

Ebenso wie Myxothiazol wirkt auch das aus *Melittangium lichenicola* Me l46 isolierte Melithiazol durch eine Hemmung des bc1-Komplexes der Atmungskette antifungisch (Sasse *et al.*, 1999). Dabei zeigt Melithiazol jedoch eine deutlich geringere Toxizität (Sasse *et al.*, 1999). Der Vergleich beider Biosynthesen schien interessant, weil die Substanzen trotz großer struktureller Ähnlichkeiten markante Unterschiede aufweisen (siehe Abbildung 1.9).

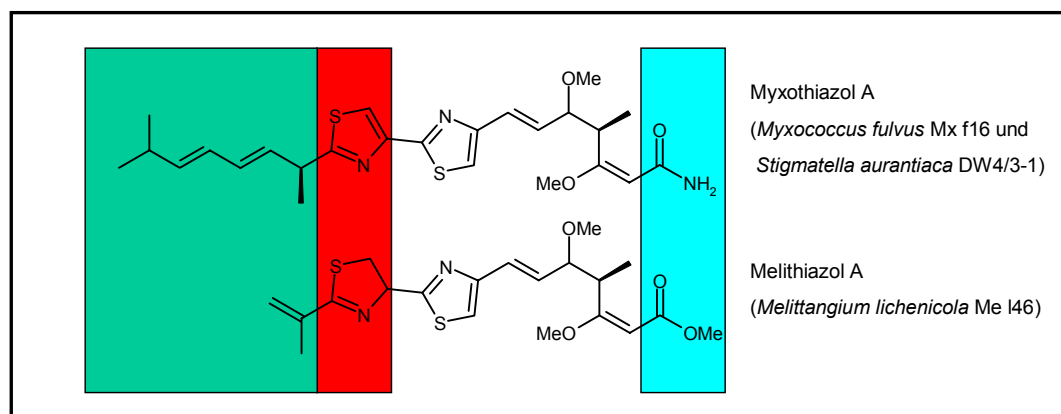


Abbildung 1.9 Struktureller Vergleich der Atmungsketteninhibitoren Myxothiazol und Melithiazol. Molekülabschnitte, in denen sich die beiden Antibiotika unterscheiden, sind mit Boxen unterlegt. Die Seitenketten sind grün und die Heterozyklen rot markiert. Hellblau sind die Molekülenden unterlegt.

Es wurde postuliert, dass die Myxothiazolbiosynthese mit einer 3-Methylbutyryl-CoA Einheit startet, welche von Leucin abgeleitet ist (Trowitzsch-Kienast *et al.*, 1986). Im Gegensatz dazu könnte in der Melithiazolbiosynthese aus dem Valinabbau stammendes Isobutyryl-CoA als Startereinheit dienen.

Der Nonadienylseitenkette des Myxothiazols steht ein 2-Isopropylenrest im Melithiazol gegenüber. Es fällt auf, dass sich die Doppelbindungen innerhalb der Dienstruktur nicht wie bei Polyketiden üblich zwischen den verknüpften Ketideinheiten befinden. Diese sollten zwischen den Kohlenstoffen 7,8 und 9,10 liegen, tatsächlich befinden sie sich jedoch in den Positionen  $\Delta^8$  und  $\Delta^{10}$  (siehe Abbildung 1.8). Die Entstehung der Doppelbindung innerhalb des Melithiazolstarters war ebenfalls unklar.

Die Myxothiazole sind durch ein Bisthiazolsystem charakterisiert. Im Gegensatz dazu zeichnet sich ein Großteil der bekannten Melithiazole durch ein Thiazolin-Thiazol-System aus. Die Bildung von Thiazolinringen durch HC Domänen nach Cystein-Einbau war geklärt (Gehring *et al.*, 1998). Wie die Oxidation zum Thiazol vonstatten geht, war zu Beginn der Arbeiten noch unklar. Der Vergleich der beiden Biosynthesegencluster sollte Hinweise auf die Entstehung der genannten Strukturelemente geben.

Alle bisher identifizierten Melithiazole enthalten einen Methylester (Bohlendorf *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu besitzen die meisten Myxothiazole ein Säureamid. Die einzige Ausnahme stellt Myxothiazol Z - das Methylester Analogon von Myxothiazol A - dar. Myxothiazol Z wird nur von sehr wenigen *Myxococcus* Stämmen produziert (Steinmetz *et al.*, 2000). Der Vergleich beider Biosynthesegencluster sollte Aufschluss über die Biosynthese der Methylester-Teilstruktur geben. Durch Fütterungsexperimente konnte in der Arbeitsgruppe Höfle gezeigt werden, dass die Methylgruppe des Esters im Myxothiazol Z aus S-Adenosyl-Methionin (SAM) stammt (Steinmetz *et al.*, 2000). Da Myxothiazol Z immer nur zusätzlich zu Myxothiazol A von den untersuchten *Myxococcus* Stämmen produziert wird, postulieren die Autoren eine Umwandlung des Säureamides in den Methylester. Bei einer analogen Bildung dieser Teilstruktur sollte der Melithiazolproduzent zusätzliche Gene enthalten, die diese Umwandlung katalysieren.

Die Beantwortung dieser Fragen trägt zum Verständnis der Biosynthesen bei und eröffnet die Möglichkeit, diese gezielt zu beeinflussen. Deshalb sollten die für die Bildung dieser Substanzen verantwortlichen Gene gesucht werden.

## 1.5 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Zu Beginn der Arbeit lag eine Cosmidgenbank des Myxothiazolproduzenten *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 vor. Die Inaktivierung eines für eine Polyketidsynthase kodierenden Genes führte zu einer Myxothiazol-negativen Mutante (Silakowski *et al.*, 1999). Mit diesem Ergebnis war gezeigt, dass das Cosmid E25 einen Teil des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters enthielt. Zu Cosmid E25 sollte ein Anschlusscosmid identifiziert werden. Nach der Sequenzierung und Annotation des vollständigen Genclusters sollte dessen biochemische und genetische Analyse erfolgen.

Weitere Ziele dieser Arbeit waren die Klonierung und Sequenzierung des Melithiazol-Biosynthesegenclusters (*mel*) und dessen *in silico* Vergleich mit dem Myxothiazol-Biosynthesegencluster (*mta*). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen Myxothiazol und Melithiazol wurde spekuliert, dass die Sequenzen der verantwortlichen Biosynthesegencluster ebenfalls ähnlich sind. Deshalb sollten aus dem Myxothiazol-Biosynthesegencluster abgeleitete Gensonden die Suche nach dem Melithiazol-Biosynthesegencluster erleichtern.

Durch biokombinatorische Versuche sollte versucht werden, neue Strukturen zu erzeugen. Dazu bedurfte es der Etablierung eines Protokolls zur genetischen Manipulation des Melithiazol-Produzenten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den in Tabelle 2.1 angegebenen Firmen in p.A. Qualität bezogen. Wenn nicht anders angegeben, haben die Firmen ihren Sitz in Deutschland.

Tabelle 2.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Substanz	Bezugsquelle
Entwickler G153 Schnellfixierbad G354	AGFA
Aceton Chloroform Ethanol Methanol 2-Propanol	J.T.Baker, Niederlande
NN'-Methylenbisacrylamid Acrylamid Protein Assay	BIORAD
Seakem <sup>®</sup> LE Agarose	Biozym
L-Methionin-methyl- <sup>13</sup> C	Cambridge Isotope Laboratories, USA
D8-DL-Valin	Campro Scientific, Niederlande
Bacto-Agar Tryptone Peptone (Trypton) Hefeextrakt	Difco
Agarose ultraPURE <sup>®</sup>	GIBCO/BRL

Substanz	Bezugsquelle
Ammoniumacetat Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA) Kaliumhydroxid	Fluka
Calciumchlorid Dihydrat Essigsäure D(+)-Glucose-Monohydrat Glycerin (87 %) Glycin Magnesiumsulfat Heptahydrat Maltose (Monohydrat) für die Mikrobiologie Natriumacetat (wasserfrei) Natriumchlorid tri-Natriumcitrat Dihydrat Natriumhydroxid Salzsäure, rauchend 37 % Stärke, löslich	Merck
Chitin Beads BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs (NEB)
Blockierungsreagenz Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl) phenyl phosphat (CSPD)	Roche Diagnostics GmbH
Ammoniumperoxodisulfat Ampicillin Natriumsalz Dimethylformamid Ethidiumbromidlösung (1 %) Formamid N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES) Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG)	ROTH

Substanz	Bezugsquelle
Maleinsäure Rotiforese <sup>®</sup> (30% ige Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid) Roti <sup>®</sup> -Load1 (4x konzentriert) Roti <sup>®</sup> -Phenol/Chloroform Natriumlaurylsulfat (SDS) NNN'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Triton-X 100 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)	ROTH
„Brillant Blue G-Colloidal Cocentrare“ Chloramphenicol Kanamycin A (Monosulfat) N-Lauroylsarcosin, Natriumsalz Saccharose Streptomycinsulfat Tetracyclinhydrochlorid Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trizma <sup>®</sup> Base)	Sigma-Aldrich, USA

Demineralisiertes Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>) zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurde mit Hilfe einer „Milli-Q Reagent Water“-Anlage der Fa. Millipore gewonnen.

## 2.2 Enzyme, „Kits“ und Nukleinsäuren

Tabelle 2.2 Bezugsquellen der verwendeten Enzyme, „Kits“ und Nukleinsäuren

Substanz	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase aus Garnelen	Amersham Life Science
Protein Assay	BIORAD
„1kb-DNA-Ladder“ „Klenow Large Fragment of DNA Polymerase I“	GIBCO/BRL



Substanz	Bezugsquelle
Oligonukleotide <i>Taq</i> DNA-Polymerase	GIBCO/BRL
TOPO TA Cloning® Kit (Version P) TOPO XL PCR Cloning® Kit	Invitrogen
Nucleobond® AX Nucleospin® Extract Nucleospin® Plasmid	Macherey und Nagel
Proteinase K	Merck
„100 bp-DNA-Ladder“ „Prestained Protein Marker“ Restriktionsendonukleasen T4-DNA Ligase	New England Biolabs (NEB)
Desoxynukleosid-Triphosphat Mischung, PCR Qualität „DIG-High-Prime“ DNA Markierungs- und Detektionskit II (zur chemilumineszenten Detektion mit CSPD) „High Pure PCR Template Preparation Kit“ „Expand™ High Fidelity PCR System“	Roche Diagnostics GmbH
Desoxyribonuclease A Ribonuclease A (RNase, DNase-frei)	ROTH
Lysozym	Serva
Klonierte <i>Pfu</i> DNA Polymerase Gigapack® III Gold Packaging Extract	Stratagene

### 2.3 Puffer und Stammlösungen

Die aufgeführten Lösungen wurden mit Hilfe eines pH-Meters auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt. Die Eichung wurde mit Hilfe von drei Eichpuffern (pH 4,01, 7,00

und 9,21) durchgeführt. Zur Sterilfiltration wurden Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm verwendet.

Tabelle 2.3 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Ammoniumacetat-Lösung (7,5 M)	NH <sub>4</sub> Ac	144,5 g	autoklavieren
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	
DNA-Auftragspuffer (6fach)	Glycerin	3 ml	
	Bromphenolblau	25 mg	
	Xylencyanol	25 mg	
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	
EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	EDTA	93,0 g	autoklavieren
	NaOH	10,0 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	
Glycerin-Lösung (10 %)	Glycerin 87 %	115 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
GYT-Lösung	Glycerin	20 ml	autoklavieren, bei 4°C lagern
	Hefeextrakt	250 mg	
	Trypton	500 mg	
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml	
HEPES-Puffer (20fach)	HEPES	23,8 g	autoklavieren, bei Bedarf unter sterilen Bedingungen verdünnen
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,5 g	
	NaOH	pH 7,2	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
IPTG-Lösung (0,1 M)	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid	240 mg	sterilfiltrieren, bei -20°C lagern
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	
Lysozym-Lösung	Lysozym	100 mg	sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Natriumacetat-Puffer (3 M; pH 5,2)	Natriumacetat	40,8 g	Natriumacetat in 80 ml Wasser lösen, pH-Wert einstellen, dann mit Wasser auf 100 ml auffüllen
	Essigsäure	pH 5,2	
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	
NaCl-Lösung (5 M)	NaCl	73,1 g	autoklavieren
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	
Proteinase K-Lösung	Proteinase K	10 mg	sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	
RNase A-Lösung (1 %)	RNase A	10 mg	sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
	(DNase-frei)		
	Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	10 µl	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 ml	
SDS-Lösung (10 %)	SDS	25,0 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	
SET-Puffer	NaCl	1,1 g	autoklavieren
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	12,5 ml	
	Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	5 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	
STET-Puffer	Saccharose	8,55 g	Triton X-100 erst nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zusetzen
	Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	5 ml	
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	10 ml	
	Triton X-100	5 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	
TAE-Puffer (50fach)	TRIZMA® Base	242,0 g	alle Komponenten in 800 ml Wasser lösen, pH-Wert mit Essigsäure einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
	Natriumacetat	82,0 g	
	Eisessig	18,6 g	
	Essigsäure	pH 7,5	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
TE-Puffer (10 mM; pH 8,0)	TRIZMA®Base	1,2 g	autoklavieren
	EDTA	0,4 g	
	10 % HCl	pH 8,0	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
Tris-Puffer (1 M; pH 7,4)	TRIZMA®Base	12,1 g	Tris in 80 ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, dann mit Wasser auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
	konz. HCl	pH 7,4	
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	
Tris-Puffer (1 M; pH 8,0)	TRIZMA®Base	12,1 g	Tris in 80 ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, dann mit Wasser auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
	konz. HCl	pH 8,0	
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	
X-Gal-Lösung	X-Gal	400 mg	bei –20°C lagern
	Dimethylformamid	ad 10 ml	

Tabelle 2.4 Stammlösungen der verwendeten Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Ampicillin 100 mg/ml	Ampicillin, Na-Salz	1,0 g	sterilfiltrieren, aliquotieren und bei –20°C lagern
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	
Chloramphenicol 35 mg/ml	Chloramphenicol	350 mg	bei –20°C lagern
	Ethanol 70 %	ad 10 ml	
Kanamycin 60 mg/ml	Kanamycin	600 mg	sterilfiltrieren, aliquotieren und bei –20°C lagern
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	
Streptomycin 100 mg/ml	Streptomycinsulfat	1,0 g	sterilfiltrieren, aliquotieren und bei –20°C lagern
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	
Tetracyclin 12 mg/ml	Tetracyclin-HCl	120 mg	bei –20°C lagern
	Ethanol 70 %	ad 10 ml	

Tabelle 2.5 Puffer und Lösungen für Hybridisierungsexperimente mit Hilfe des DIG-Systems der Fa. Roche Diagnostics

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Anti-Digoxigenin-AP-Lösung			bei Bedarf 1:10 000 in 1fach Blockierungslösung verdünnen
Blockierungslösung (10fach)	Blockierungs-Reagenz	25,0 g	unter Erwärmen in Maleinsäurepuffer lösen, autoklavieren
	Maleinsäurepuffer	ad 250 ml	
CSPD <sup>®</sup>			wurde entgegen den Angaben des Herstellers unverdünnt für die Detektion eingesetzt
Denaturierungs-Lösung 1	NaOH	20,0 g	autoklavieren
	NaCl	87,7 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
Detektionspuffer	TRIZMA <sup>®</sup> Base	12,1 g	autoklavieren
	NaCl	5,8 g	
	10 % HCl	pH 9,5	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
Hybridisierungs-Lösung	20 x SSC	125 ml	bei 4°C lagern
	Formamid	250 ml	
	N-Lauroylsarcosin,	5 ml	
	Natriumsalz 10 %		
	SDS 10 %	1 ml	
	Blockierungsreagenz 10fach	100 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	11,6 g	alle Komponenten in 700 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 5 N NaOH einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
	NaCl	8,8 g	
	NaOH	pH 7,5	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Na-N-Lauroylsarcosin-Lösung 10 %	Na-N-Lauroylsarcosin H <sub>2</sub> O	5,0 g ad 50 ml	sterilfiltrieren
Neutralisations-Lösung 1 (Southern Blot)	TRIZMA® Base NaCl konz. HCl H <sub>2</sub> O	60,6 g 175,3 g pH 7,5 ad 1 l	alle Komponenten in 800 ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Neutralisations-Lösung 2 (Colony Hybridisierung)	TRIZMA® Base NaCl konz. HCl H <sub>2</sub> O	121,1 g 175,3 g pH 7,5 ad 1 l	alle Komponenten in 800 ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Proteinase K-Lösung	Proteinase K 2 x SSC	40 mg ad 20 ml	sterilfiltrieren, bei Bedarf frisch herstellen
20 x SSC	NaCl Natriumcitrat 10 % HCl H <sub>2</sub> O	175,3 g 88,2 g pH 7,0 ad 1 l	alle Komponenten in 800 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 10 % HCl einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
2 x SSC	20 x SSC H <sub>2</sub> O	50 ml ad 500 ml	
0,5 x Waschlösung (hochstringent)	20 x SSC 10 % SDS H <sub>2</sub> O	12,5 ml 5 ml ad 500 ml	
2 x Waschlösung (niedrigstringent)	20 x SSC 10 % SDS H <sub>2</sub> O	25 ml 5 ml ad 500 ml	
Waschpuffer	TWEEN® Maleinsäurepuffer	3 ml ad 1000 ml	

Tabelle 2.6 Puffer und Lösungen für die Extraktion und Reinigung von Intein-Chitin-Fusionsproteinen mit Hilfe des Impact™ I-Einschritt-Reinigungssystem der Fa. NEB

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Dithiothreitol-Lösung (DTT, 1 M)	DTT	0,09 g	sterilfiltrieren, aliquotieren, bei –20°C lagern
	Natriumacetat-Puffer (1 M; pH 5,2)	0,2 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 20 ml	
Intein-Elutionspuffer (pH 8,0)	Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	2 ml	alle Komponenten in 60 ml Wasser lösen, anschließend auf 100 ml auffüllen
	NaCl (5 M)	10 ml	
	SDS (10%)	10 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	
Säulen- und Zellysispuffer (pH 8,0)	Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	20 ml	alle Komponenten in 900 ml Wasser lösen, anschließend auf 1 l auffüllen
	NaCl (5 M)	100 ml	
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	0,2 ml	
	Triton X-100	1 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
Spaltungspuffer (pH 8,0)	Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	2 ml	Triton X-100 erst nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zusetzen, die übrigen Komponenten in 80 ml Wasser lösen, anschließend auf 100 ml auffüllen
	NaCl (5 M)	1 ml	
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	0,2 ml	
	DTT-Lösung (1 M)	3 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Tabelle 2.7 Puffer und Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Ammoniumperoxo- disulfat-Lösung (APS)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	30 mg	bei Bedarf frisch herstellen
	H <sub>2</sub> O	300 µl	

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Elektrodenpuffer (10fach; pH 8,6)	TRIZMA® Base	30 g	alle Komponenten in 900 ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen und auf 1 l auffüllen
	Glycin	144 g	
	SDS	15 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
Sammelgel (5 %)	Rotiforese® Gel 30	1 ml	alle Komponenten des Gels mischen, TEMED und APS erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zusetzen, Polymerisation bei RT
	Sammelgelpuffer	1,9 ml	
	H <sub>2</sub> O	4,6 ml	
	TEMED	10 µl	
	APS-Lösung	100 µl	
Sammelgelpuffer (4fach; pH 6,7)	TRIZMA® Base	30,5 g	pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklavieren
	10 % SDS-Lösung	20 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	
Trenngel (10 %)	Rotiforese® Gel 30	5 ml	Vorgehensweise siehe Sammelgel
	Trenngelpuffer	3,8 ml	
	H <sub>2</sub> O	6,2 ml	
	TEMED	10 µl	
	APS-Lösung	100 µl	
Trenngelpuffer (4fach; pH 8,8)	TRIZMA® Base	91 g	pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklavieren
	10 % SDS-Lösung	20 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

Tabelle 2.8 Lösungen zur Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Färbelösung	„Brilliant Blue G	20 ml	Konzentrat 1:5 verdünnen, hieraus gebrauchsfertige Lösung ansetzen
	Colloidal Concentrate”		
	H <sub>2</sub> O	20 ml	
	Methanol	10 ml	
Fixierer	Methanol	200 ml	
	Eisessig	50 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	



Tabelle 2.9 Puffer und Lösungen zum Anlegen einer Cosmidgenbank

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
Gelatine-Lösung (2 %)	Gelatine	2,0 g	autoklavieren
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	
MgSO <sub>4</sub> -Lösung (1 M)	MgSO <sub>4</sub>	30,0 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	
Maltose-Lösung (10 %)	Maltose	25,0 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	
SM-Puffer	NaCl	5,8 g	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,0 g	
	Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	50 ml	
	2 % Gelatine-Lösung	5 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

## 2.4 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Alle angegebenen Medien wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte vor dem Autoklavieren mit Natronlauge bzw. Salzsäure. Nachfolgend wurden die Medien bei 121°C für 20 min und 1,21 bar sterilisiert. Antibiotika und andere Zusätze wurden nach Abkühlen des Mediums auf < 50°C unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Festmedien enthielten 1,6 % (w/v) Agar.

Tabelle 2.10 Herstellung von Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung & Aufbewahrung
IR1-Medium (Steinmetz <i>et al.</i> , 2000)	Sojamehl	1,0 g	alle Komponenten in 900 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 20 % KOH einstellen und auf 1 l auffüllen
	Pepton (Marcor)	4,0 g	
	Stärke löslich	2,0 g	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g	
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g	
	HEPES	10,0 g	
	20 % KOH	pH 7,4	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Trypton	10,0 g	alle Komponenten in 900 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 5 N NaOH einstellen und auf 1 l auffüllen
	Hefeextrakt	5,0 g	
	NaCl (Low Salt)	5,0 g	
	5 N NaOH	pH 7,5	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
M7-Medium (Sasse <i>et al.</i> , 1995)	Probion ME	5,0 g	alle Komponenten in 900 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 20 % KOH einstellen und auf 1 l auffüllen
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,0 g	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g	
	Hefeextrakt	1,0 g	
	Stärke löslich	5,0 g	
	HEPES	10,0 g	
	20 % KOH	pH 7,4	
	H <sub>2</sub> O	ad 990 ml	
	20 % Glucose-Lsg.	10 ml	
	Vitamin B12-Lsg. 1mg/10ml, sterilfiltriert	1 ml	nach dem Autoklavieren steril zusetzen nach dem Autoklavieren steril zusetzen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung & Aufbewahrung
Probion-Medium (Kunze <i>et al.</i> , 1992) modifiziert nach B. Kunze	Probion ME 069 Stärke löslich $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ HEPES XAD-Suspension 20 % KOH H <sub>2</sub> O	3,0 g 3,0 g 2,0 g 0,5 g 11,9 g 1 ml pH 7,2 ad 1 l
Trypton-Medium (Silakowski <i>et al.</i> , 1998)	Trypton $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 20 % KOH H <sub>2</sub> O	10,0 g 2,0 g pH 7,2 ad 1 l

Die Endkonzentrationen der Antibiotika betrugen, soweit nicht anders angegeben:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	35 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Streptomycin	120 µg/ml
Tetracyclin	12 µg/ml

## 2.5 Geräte und Materialien

Tabelle 2.11 Besondere Geräte/Materialien

Entwickler G153	AGFA
Entwicklermaschine Curix 60	
Schnellfixierer G354	

Hybridisierungssofen Hyperfilm „Microspin Column“ Ultrospec 2100pro UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Pharmacia Biotech
ABI 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems
Elektroporationsküvetten Gene Pulser Pulse Controller	Biorad
Standard Power Pack Elektrophoresekammer Typ Minigel	Biometra
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPont Instruments
Zentrifuge 5804R Mastercycler gradient	Eppendorf
Roboter vom Typ Q-Bot	Genetix
Biofuge pico	Heraeus
Multitron Schüttler	Infors
Fotodokumentation	Intas
HeraeusLaminAir® Werkbank	Kendro Laboratory Products GmbH
L009 Rotator	Kisker
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Membranfilter Porengröße 0,22 µm	Milipore
Kryoröhrchen	Nalgene
Bandolin Sonoplus	Omnilab
Laborautoklaven Typ Fedegari	Tecnomara AG
Speed Vac® SPD 121P	Savant

## 2.6 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

### 2.6.1 Verwendete Bakterienstämme

#### 2.6.1.1 *E. coli*

Tabelle 2.12 Auflistung der verwendeten *E. coli* Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
XL1-Blue MRF'	D( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>f</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ]	(Jerpseth <i>et al.</i> , 1992)
Sure <sup>®</sup>	e14' (McrA') Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC</i> [F' <i>proAB lacI<sup>f</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ]	Stratagene (USA)
TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen (USA)
GM2163	F' <i>ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136 (Str<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9 (Cam<sup>r</sup>) dcm-6 mcrB1 hsdR2(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) mcrA</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

### 2.6.1.2 Myxobakterien

Tabelle 2.13 Auflistung der verwendeten Myxobakterien

Bezeichnung	Referenz
<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	(Qualls <i>et al.</i> , 1978); (Qualls <i>et al.</i> , 1978)
<i>Melittangium lichenicola</i> Me l46	(Bohlendorf <i>et al.</i> , 1999); (Sasse <i>et al.</i> , 1999)
<i>Myxococcus fulvus</i> Mx f333/8	(Steinmetz <i>et al.</i> , 2000)

#### 2.6.1.2.1 Aus *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 erzeugte Mutanten

Tabelle 2.14 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutanten

Stamm	Beschreibung
ERM4	<i>mtaF</i> (D1002L, C1005T, G1006L), entstanden aus ESW21/1 durch zweifache homologe Rekombination
ESW21/1	<i>mtaF</i> ::pESW17
ESW200	<i>mtaH</i> ::pESW26
ESW303	<i>mtaG</i> ::pESW24
ESW312	<i>mtaB</i> ::pESW25
ESW321	<i>mtaB</i> (L1666A, R1671K, G1672A, G1673L), entstanden aus ESW312 durch zweifache homologe Rekombination
ESW331	<i>mtaG</i> ΔMOX <sub>2284-3324</sub> , entstanden aus ESW303 durch zweifache homologe Rekombination
ESW368	<i>mtaC</i> ::pESW33
ESW371	<i>mtaD</i> ::pESW36
ESW380	<i>mtaB</i> ::pESW41
ESW385	<i>mtaE</i> ::pESW45
ESW400	<i>mtaC</i> ΔOX <sub>3280-3919</sub> , entstanden aus ESW368 durch zweifache homologe Rekombination
ESW392	<i>mtaD</i> ΔOX <sub>3599-4430</sub> , entstanden aus ESW371 durch zweifache homologe Rekombination

Stamm	Beschreibung
ESW414	<i>mtaB</i> (G1860I, G1861I, G1863V), entstanden aus ESW380 durch zweifache homologe Rekombination
ESW409	<i>mtaE</i> (D1042A, C1045T), entstanden aus ESW385 durch zweifache homologe Rekombination
ESW435	<i>mtaH</i> ::pESW64
ESW444	<i>mtaH</i> $\Delta_{333-665}$ , entstanden aus ESW435 durch zweifache homologe Rekombination
ESW462	<i>mtaX</i> ::pESW204
ESW463	<i>mtaH</i> $\Delta_{333-665}$ , <i>mtaX</i> ::pESW204
ESW602	<i>mtaH</i> ::pESW234
ESW609	<i>mtaD</i> ::pESW241
ESW610	<i>mtaD</i> ::pESW241
ESW613	<i>mtaB</i> ::pMSW17
ESW626	<i>meID</i> <sub>swap</sub> , entstanden aus ESW609 durch zweifache homologe Rekombination
ESW632	<i>meID</i> <sub>swap</sub> , entstanden aus ESW610 durch zweifache homologe Rekombination geht aus ESW 610 durch zweites Cross-Over hervor
ESW643	<i>mtaB</i> (G1860I, G1861I, G1863V), <i>mtaB</i> ::pMSW17

## 2.6.2 Plasmide

Tabelle 2.15 Auflistung der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Größe	Herkunft
pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , f1 ori	3908 bp	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO	Kan <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>ccdB</i> , ColE1 ori	3519 bp	Invitrogen
pBluescript <sup>®</sup> IIS(-)	Amp <sup>r</sup> <i>lacZ'</i> , ColE1 ori	2961 bp	Stratagene
pUC18	Amp <sup>r</sup> , <i>lacZ'</i> , ColE1 ori	2686 bp	(Vieira & Messing, 1982)

Bezeichnung	Eigenschaften	Größe	Herkunft
pCYB2	Amp <sup>r</sup> , <i>lacI</i> , ColE1 ori	6843 bp	NEB
pSWU41	pBluescript-Derivat, Kan <sup>r</sup> , <i>sacB</i>	4649 bp	(Wu & Kaiser, 1996)
Supercos I	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , ColE1 ori	7939 bp	Stratagene

### 2.6.3 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide

Tabelle 2.16 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide

Name	Beschreibung
pE25/800	837 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern EXPMTADFMN1+EXPMTAD2 von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pE25/700	720 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern EXPMTACFMN1+EXPMTAC2 von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW6	524 bp PCR-Amplifikat generiert mit Primern SW3+SW4 von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW8	7,3 kb <i>HindIII/BglII</i> Fragment aus Cosmid E3 ligiert in pUC18/ <i>HindIII/BamHI</i>
pESW11.7	522 bp PCR-Amplifikat generiert mit Primern SW1+SW2kor von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW14	524 bp PCR-Amplifikat generiert mit Primern ERI MTAB FOR+ERI MTAB REV von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW16	514 bp PCR-Amplifikat generiert mit Primern ERII MTAB FOR2+ERII MTAB REV2 von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW17	DNA-Fragment aus pESW6 gewonnen durch Restriktion mit <i>SpeI/KpnI</i> und DNA-Fragment aus pESW11.7 gewonnen durch Restriktion mit <i>KpnI/SacI</i> ; unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>SpeI/SacI</i>
pESW19.7	597 bp PCR-Amplifikat generiert mit Primern MOX3+MOX4 von Matrize Cosmid E201; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW22.4	611 bp PCR-Amplifikat generiert mit Primern MOX1+MOX2kor von Matrize pESW8; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO



Name	Beschreibung
pESW24	DNA-Fragment aus pESW22.4 gewonnen durch Restriktion mit <i>SacI/SaI</i> und DNA-Fragment aus pESW19.7 gewonnen durch Restriktion mit <i>SaI/XbaI</i> ; unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>SacI/XbaI</i>
pESW25	DNA-Fragment aus pFGE10.2 gewonnen durch Restriktion mit <i>SacI/XbaI</i> ; kloniert in pSWU41/ <i>SacI/Spel</i>
pESW26	532 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern E3+E4 von Matrize Cosmid E201; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW33	604 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern NADC1FOR+NADC2REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>NotI/BglII</i> und 600 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern NADC3FOR+NADC4REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>BglII/Spel</i> unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>NotI/Spel</i>
pESW36	510 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern NADD1FOR+NADD2REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>NotI/XhoI</i> und 609 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern NADD3FOR+NADD4REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>XhoI/Spel</i> unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>NotI/Spel</i>
pESW41	517 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern ENO1FOR+ENO2REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>NotI/SspI</i> und 508 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern ENO3FOR+ENO4REV von Matrize E25; hydrolysiert mit <i>SspI/Spel</i> unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>NotI/Spel</i>
pESW45	514 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern METE1FOR+METE2REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>SacI</i> und <i>KpnI</i> und 506 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern METE3FOR+METE4REV von Matrize Cosmid E25; hydrolysiert mit <i>KpnI</i> und <i>XbaI</i> ; unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>SacI/XbaI</i>
pESW47	618 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern ISO1+ISO2 von Matrize Cosmid E201; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW51	622 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern ISO3+ISO4 von Matrize Cosmid E201; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW64	DNA-Fragment aus pESW47 gewonnen durch Restriktion mit <i>PvuII/PstI</i> und DNA-Fragment aus pESW51 gewonnen durch Restriktion mit <i>PstI/XbaI</i> ; unidirektionell ligiert in pSWU41/ <i>SmaI/XbaI</i>
pESW110	DNA-Fragment aus pE25/800 gewonnen durch Restriktion mit <i>NdeI/EcoRI</i> ; kloniert in pCYB2/ <i>NdeI/EcoRI</i>
pESW113	DNA-Fragment aus pE25/700 gewonnen durch Restriktion mit <i>NdeI/EcoRI</i> ; kloniert in pCYB2/ <i>NdeI/EcoRI</i>

Name	Beschreibung
pESW204	458 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern MXISO3+MXISO4 von genomischer DNA von <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW224	DNA-Fragment aus pMSW1 gewonnen durch Restriktion mit <i>EcoRI/XbaI</i> ; kloniert in pKC1132/ <i>EcoRI/XbaI</i>
pESW225	1088 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern MLD3 + MLD4 von Matrize Cosmid M2; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW232	1405 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern ML3 + ML4 von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW236	631 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern MYX1FOR + MLD2 von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW237	620 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern MLD5 + MYX6REV von Matrize Cosmid E25; kloniert in pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO
pESW241	DNA-Fragment aus pESW237 gewonnen durch Restriktion mit <i>HindIII/BamHI</i> und DNA-Fragment aus pMSW6 gewonnen durch Restriktion mit <i>XbaI/HindIII</i> ; unidirektionell in pSWU41/ <i>XbaI/BamHI</i>
pESW243	DNA-Fragment aus pESW26 gewonnen durch Restriktion mit <i>NotI/SpeI</i> ; ligiert in pMSW12/ <i>NotI/XbaI</i>
pFGE10.2	DNA-Fragment aus pESW16 gewonnen durch Restriktion mit <i>StuI/SpeI</i> ; ligiert in pESW14/ <i>StuI/SpeI</i>
pMSW1	2,1 kb <i>EcoRI/BglII</i> -Fragment aus Cosmid M2; ligiert in pUC18/ <i>EcoRI/BamHI</i>
pMSW3	pESW224 hydrolysiert mit <i>EcoRI</i> und dephosphoryliert; ligiert mit 986 bp <i>EcoRI/EcoRI</i> -Fragment aus pMSW21
pMSW12	3,2 kb <i>StuI/StuI</i> -Fragment aus Cosmid M1; kloniert in pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO
pMSW13	wie pMSW12 aber entgegengesetzte Orientierung
pMSW13-2	pMSW13 hydrolysiert mit <i>BamHI</i> und religiert, dabei Deletion von 1,4 kb
pMSW5	DNA-Fragment aus pESW236 gewonnen durch Restriktion mit <i>XbaI/NotI</i> und 1,1 kb <i>NotI/EcoRI</i> Fragment aus Cosmid M2 unidirektionell ligiert in pBluescript <sup>®</sup> IIS(-)/ <i>XbaI/EcoRI</i>
pMSW6	DNA-Fragment aus pESW225 gewonnen durch Restriktion mit <i>EcoRI/HindIII</i> ; ligiert in pMSW5/ <i>EcoRI/HindIII</i>
pMSW15	4,9 kb PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern MLB1FOR + ML2 von Matrize Cosmid M1; kloniert in pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO, Sequenzfehler in Pos. 2138

Name	Beschreibung
pMSW16	4,9 kb PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern MLB1FOR + ML2 von Matrize Cosmid M1; kloniert in pCR®-XL-TOPO, Sequenzfehler in Pos. 3854
pMSW17	DNA-Fragment aus pESW232 gewonnen durch Restriktion mit <i>MfeI/XbaI</i> und 1,2 kb <i>PstI/MfeI</i> Fragment aus pMSW15 ligiert mit dem durch <i>PstI/XbaI</i> Restriktion gewonnenen 7,2 kb DNA-Fragment aus pMSW16
pMSW20	DNA-Fragment aus pESW26 gewonnen durch Restriktion mit <i>NotI/SpeI</i> ; ligiert in pMSW13-2/ <i>NotI/XbaI</i>
pMSW21	986 bp PCR-Amplifikat gewonnen mit Primern bla-up + bla-down von Matrize pBluescript-II-KS; kloniert in pTOPO-blunt
pMSW22	pESW243 hydrolysiert mit <i>ClaI</i> und religiert, dabei Deletion von 165 bp unter Erhalt des Leserahmens in <i>melK</i>

## 2.6.4 Oligonukleotide

Tabelle 2.17 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Bemerkung
bla-up	5'-GGG AAA TGT GCG CGG AAC CC-3'	
bla-down	5'-GGT CTG ACA GTT ACC AAT GC-3'	
E3	5'-TCG GCA GGA AGA AGT CGT C-3'	
E4	5'-CTC GGG ATC CAG CAG GTA G-3'	
EcoRISEQ	5'-CGA GCT GAT CCG GGA CGA CAT AGG-3'	Seq
ENO1FOR	5'-TGC TCG <b>CGG CCG CCG</b> AGA ACG CAC AGT CGA T-3'	<i>NotI</i>
ENO2REV	5'-CCG <b>AAT ATT</b> ATC ACG ATC AGG TAC GTC GCG TC-3'	<i>SspI</i>
ENO3FOR	5'-GGG <b>AAT ATT</b> GGT TGG CAT TGG CCT CGA GCT GG-3'	<i>SspI</i>
ENO4REV	5'-GGA <b>CTA GTT</b> GAT GGA CAG CGC CGT CAG GC-3'	<i>SpeI</i>
ENO5SEQ	5'-ACG CTG CCC AGC TTG CCG CG-3'	Seq
ENOABSEQ	5'-GAC TGG TTG TGG CAG AGG TCT	Seq
ERIMTABFOR	5'-GGC ATC GCC CGG CAG GGT TTG-3'	
ERIMTABREV	5'- <b>AAG GCC</b> TTA TCC GCC AGG AGG GCC CAA GCC TCG GGC CCT G-3'	<i>StuI</i>
ERIIMTABFOR2	5'- <b>AAG GCC</b> TTG CTG GCC GCA CGG CTT GCT GAA-3'	<i>StuI</i>
ERIIMTABREV2	5'-AGC TTG GTG CGC ACG AGC CTG-3'	
EXPMTACFMN1	5'-GGA <b>ATT CCA TAT</b> GGA GCG TCA GCC AGC AG-3'	<i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>
EXPMTACFMN2	5'-CGG <b>AAT TCC</b> AGG GCA CCC TCT TCC CAC-3'	<i>EcoRI</i>

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'Richtung	Bemerkung
EXPMTADFMN1	5'-GGA <b>ATT CCA TAT</b> GAG CGC GCC CTC GGC GAG C-3'	<i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>
EXPMTADFMN2	5'-TCG <b>AAT TCC</b> AGT GAA GCA TCC GCC GCC TTG-3'	<i>EcoRI</i>
ISO1FOR	5'-ACG <b>AGT CTG</b> ACG CCT ACC GGG G-3'	<i>SacI</i>
ISO2REV	5'-GGC <b>TGC AGG</b> TCA GCG CGG AAG AGG-3'	<i>PstI</i>
ISO3FOR	5'-ACC <b>TGC AGG</b> ATG ATC TTC CCG CCC GAG-3'	<i>PstI</i>
ISO4REV	5'-CCT <b>CTA GAT</b> GGT TGC CCC CGA TGA CG-3'	<i>XbaI</i>
ISO5SEQCOR	5'-CCC TTC CCC TGA GCC AGG TCG-3'	Seq
L1	5'-GGA CAG CCA GAC GCC AGG GA-3'	
L2	5'-GAC CGG CAC TGA CCG GCA AC-3'	
MEL1	5'-ATC CGG GTC TTC GCG CGC GAC A-3'	
MEL3L	5'-GGA TCC TCC AGG AAG AGC GAG G-3'	
METE1FOR	5'-CAG <b>AGC TCG</b> AGG TCA TGT TGC AGT CGC-3'	<i>SacI</i>
METE2REV	5'-GGG <b>GTA CCG</b> AAC GCG AGC ACC TTG CGC ACC G-3'	<i>KpnI</i>
METE3FOR	5'-GGG <b>GTA CCG</b> GGT ATG CCT CCG ACT TGA-3'	<i>KpnI</i>
METE4REV	5'-GCT <b>CTA GAT</b> GAG CCC GAA GCG CTT GGA C-3'	<i>XbaI</i>
METE5SEQ	5'-CTG CGG CAG AAG CTC CCA GGC-3'	Seq
METFSEQ	5'-GGG GTT CTC GTG GAT CTC GCT-3'	Seq
ML2	5'-CAC CGC <b>CAA TTG</b> CTC GAT GAC GAG CGT-3'	<i>MfeI</i>
ML3	5'-CTC GAG <b>CAA TTG</b> GAG ACC CTG CAG CCC-3'	<i>MfeI</i> ,
ML4	5'-GTG <b>ATC TAG</b> ACA CAT CTG CGG CGT CTG-3'	<i>XbaI</i>
MLB1FOR	5'-GCA GAA <b>AGC TTT</b> CCT CGA TCC GAG AAT-3'	<i>HindIII</i>
MLD2	5'-TTG <b>AGC GGC CGC</b> CTG ACG AAG GAA GAG C-3'	<i>NotI</i>
MLD3	5'-ATC <u>GAA TTC</u> CTC GGC CGC GAG-3'	<i>EcoRI</i>
MLD4	5'-GAT <b>CAA GCT</b> TGC CGT TGG CCG TG-3'	<i>HindIII</i>
MLD5	5'-CGG <b>CAA GCT</b> TGA TCG AAG CGC-3'	<i>HindIII</i>
MLDSEQ1	5'-AAG TAC ACG GAT CGG CGC AGC CAC-3'	Seq
MLSQ2	5'-AGG ACA GTG GCC CAC CTT CGA-3'	Seq
MLSQ4	5'-GAC TCG GCG GCG GAT CGG CC-3'	Seq
MLSQ5	5'-GTG GCC TGG TAC CGC GGA CG-3'	Seq
MLSQ6	5'-CGA AAG TCG GGT TTT CCG GG-3'	Seq
MLSQ7	5'-ACC CCG AGG CGC CGG GGA AGA-3'	Seq
MLSQ8	5'-GCC GGA TGG GGC CTG CAA GG-3'	Seq
MLSQ9	5'-GGT CGA GGT CAT CTC CGA GCA-3'	Seq
MLSQ10	5'-TTC CGC GAC GCG GTG CTC GC-3'	Seq
MLSQB	5'-GAA TGC TCC GAC CGT GCC GCT CTA-3'	Seq
MOX1	5'-GGA TGA ACG CGG AAA CCG TCT-3'	
MOX2COR	5'-AGG <b>TCG ACC</b> TGG GGC GCC TTG CGG TGA-3'	<i>SalI</i>
MOX3	5'-ACG <b>TCG ACC</b> CCG AGG ACA TCC CCG CA-3'	<i>SalI</i>

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'Richtung	Bemerkung
MOX4	5'-AGG CGC AGC GCG GAT TCG AT-3'	
MOXSEQ	5'-AGA CGC CAG GGA CGT GGC TT-3'	Seq
MXISO1	5'-CTG GGC TGG CGC GAA GGA GA-3'	
MXISO2	5'-CAG CAG CGT CAT GAT GTG GGA GAT-3'	
MXISO3	5'-TCC TCG CTG ACG CTG CTG GTG-3'	
MXISO4	5'-ATG TCG GAT GTG CGG CTG TC-3'	
MYX1FOR	5'-GCT <b>CTA GAT</b> CAA CCT GAC CCT CTT CAA C-3'	<i>XbaI</i>
MYX6REV	5'-CGG <b>GAT CCA</b> TCG ACT GCC GCA AC-3'	<i>BamHI</i>
NADC1FOR	5'-ATC <b>TGC GGC CGC</b> TTC TTC CTG AAG GAG AGA T-3'	<i>NotI</i>
NADC2REV	5'-TGG <b>AGA TCT</b> CTC GAC GTA GTA GGC CGC-3'	<i>BglII</i>
NADC3FOR	5'-ATG <b>AGA TCT</b> CAT GGC CTC GTG GGT GGC G-3'	<i>BglII</i>
NADC4REV	5'-GAA <b>CTA GTC</b> CGT CGG AAG CAC C-3'	<i>SpeI</i>
NADC5SEQ	5'-AAG CGC CCG TCG ATC GAG C-3'	Seq
NADD1FOR	5'-CAA <b>GGC GGC CGC</b> GCT GGT CAG CCT C-3'	<i>NotI</i>
NADD2REV	5'-CCG <b>GCT CGA GAT</b> TCG ACG TCA ATT CCC CAG G-3'	<i>XhoI</i>
NADD3FOR	5'-GCC <b>CCT CGA GTT</b> GAG GCG TTA CCT GG-3'	<i>XhoI</i>
NADD4REV	5'-CCG <b>GAC TAG TGC</b> CAG ACA TCC CCA CGA T-3'	<i>SpeI</i>
NADD5SEQ	5'-CAA GAT CCA GGG CTA TCG CA-3'	Seq
RME1	5'-CGC GTT CCG GTG GCA GAC-3'	
RME2	5'-TGG GCC TTT GCG TTC ACC-3'	
SW1	5'-AGG TGG GGC CGA AGC CGA CGT TG-3'	
SW2	5'-GGG <b>GTA CCG</b> ATG AGG AGC ACG CGC GAG AAG GCC GG-3'	<i>KpnI</i>
SW3	5'-GGG <b>GTA CCC</b> TCC ACT CGG CCG ACC TGA TTG AC-3'	<i>KpnI</i>
SW4	5'-GGA TGC CGT GCA GGT GCT TCT-3'	
THIA2FOR	5'-CGA AGG AGC <b>ATA TGC</b> CGG ATG CCG CGC GG-3'	Seq

Erzeugte Restriktionsschnittstellen sind fett unterlegt. Natürlicherweise vorhandene Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Oligonukleotide, die zur Sequenzierung von PCR-Amplifikaten verwendet wurden, sind mit Seq markiert.

## 2.7 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

Myxobakterien wurden bei 30°C in einem Schüttelinkubator bei 170 rpm inkubiert. Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37°C und 170 rpm. Die autoklavierten

Medien wurden unter sterilen Bedingungen inokuliert. Falls erforderlich wurde dem Medium ein Antibiotikum (siehe Tabelle 2.4) zugesetzt.

### **2.7.1 *Escherichia coli***

*E. coli* wurde in 3 ml antibiotika-haltigem LB-Medium (siehe Tabelle 2.10) über Nacht inkubiert. 1 ml Bakterienkultur wurden mit 1 ml 50 % Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren (Sambrook *et al.*, 1989). Zur erneuten Kultivierung wurde mit einer sterilen Impföse ein Tropfen der Glycerin-Dauerkultur auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte nach dem 13-Strich-Verfahren (Schlegel, 1992) vereinzelt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht konnte mit den erhaltenen Einzelkolonien Flüssigmedium angeimpft werden.

### **2.7.2 *Stigmatella aurantiaca* DW 4/3-1 und davon abgeleitete Mutanten**

Mit einer Einzelkolonie von *S. aurantiaca* DW4/3-1 (Durchmesser ca. 5mm) wurden 10 ml Trypton-Medium (siehe Tabelle 2.10) angeimpft und bis zum Erreichen einer Zelldichte von  $4-5 \times 10^8$  Zellen/ml kultiviert. Mit 5 ml dieser Kultur wurden 50 ml frisches Trypton-Medium (in 250 ml Erlenmeyerkolben) angeimpft und inkubiert. Die Zellen aus 15 ml Kultur wurden durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 20°C für sedimentiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Trypton-Medium / 25 % Glycerin aufgenommen. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Für eine erneute Anzucht wurden ca. 100 µl des gefrorenen Gemisches mit einer sterilen Impföse auf einer Trypton-Agarplatte verteilt und 4 Tage bei 30°C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurde Trypton-Flüssigmedium inokuliert .

### **2.7.3 *Melittangium lichenicola* Me I46**

Analog zu der unter 2.7.2 beschriebenen Vorgehensweise wurde das Kulturvolumen von *M. lichenicola* Me I46 schrittweise erhöht. Die Kultivierung erfolgte in M7-Medium (siehe Tabelle 2.10). Aufgrund der unlöslichen Mediumsbestandteile und des nur

teilweise dispersen Wachstums war die Bestimmung der Zelldichte nicht möglich. Zur Konservierung wurden 50 ml Kultur (in 250 ml Erlenmeyerkrügen) unter o.a. Bedingungen abgeerntet und das Sediment in 1,5 ml Trypton-Medium / 25 % Glycerin aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die erneute Anzucht wurde M7-Agar (siehe 2.4) verwendet.

#### **2.7.4 *Myxococcus fulvus* Mx f333/8**

Die schrittweise Erhöhung des Kulturvolumens von *M. fulvus* Mx f333/8 erfolgte analog zu der unter 2.7.2 beschriebenen Vorgehensweise. Der Stamm wurde in IR1-Medium (siehe Tabelle 2.1) kultiviert. Die Zelldichte konnte aufgrund der unlöslichen Mediumsbestandteile nicht exakt bestimmt werden. 50 ml Kultur (in 250 ml Kolben) wurden nach Zusatz von 1 % (v/v) XAD-Adsorberharz 4-5 Tage bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Extraktion von Myxothiazol A und Myxothiazol Z erfolgte wie bei (Steinmetz *et al.*, 2000) beschrieben. Der Extrakt diente bei der mit Dioden-Array-Detektion gekoppelter HPLC durchgeführten phänotypischen Analyse als Standard (Abbildung 3.63)

### **2.8 Isolierung prokaryontischer DNA**

#### **2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Myxobakterien**

Diese Methode eignet sich zur Präparation hochmolekularer, genomischer DNA aus Myxobakterien (Neumann *et al.*, 1992).

*S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde wie unter 2.7.2 beschrieben kultiviert. Die Zellen aus 50 ml Kultur wurden für 15 min bei  $20^{\circ}\text{C}$  und 5000 rpm sedimentiert und anschließend in 5 ml SET-Puffer (siehe Tabelle 2.3) resuspendiert. Nach Zusatz von 500  $\mu\text{l}$  Lysozym-Lösung (10 mg/ml, siehe Tabelle 2.3) und 500  $\mu\text{l}$  Proteinase K Lösung (1 mg/ml, siehe Tabelle 2.3) wurde 2 h bei  $55^{\circ}\text{C}$  unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Das Aussalzen der Proteine erfolgte durch Zugabe von 2 ml 5M NaCl-Lösung. Anschließend wurden 7 ml Chloroform zugegeben und die Ansätze in einem Überkopfschüttler mindestens 1 h inkubiert. Nach zehnminütiger

Zentrifugation bei 20°C und 4000 rpm wurde die wässrige Phase in ein frisches 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und die DNA durch Zugabe von 1 VT eisgekühltem Isopropanol gefällt. Die DNA wurde vorsichtig unter Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert, anschließend dreimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Zum Lösen der DNA wurde das Pellet mit 1 ml TE-Puffer (siehe Tabelle 2.3) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die Qualität der DNA-Präparation wurde wie unter 2.9 beschrieben mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft.

### **2.8.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der „boiling method“**

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte gemäß dem bei (Sambrook *et al.*, 1989) aufgeführten Protokoll. Das Zellsediment von 1,5 ml einer antibiotika-haltigen Übernachtskultur wurde in 500 µl STET-Puffer (siehe Tabelle 2.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 90 Sekunden bei 96°C inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurden die Zelltrümmer mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 500 µl Isopropanol und 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung (siehe Tabelle 2.3) versetzt. Durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 13 000 rpm wurde die DNA sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Zum Lösen wurde das Sediment in 40 µl sterilem H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (siehe Tabelle 2.3) aufgenommen. Erfahrungsgemäß waren 3 µl dieser Präparation für die Restriktionsanalyse in 50 µl-Ansätzen ausreichend.

### **2.8.3 Präparation von Plasmid-DNA mit dem Nucleospin® Plasmid-Kit**

Die Präparation von hochreiner Plasmid-DNA für empfindliche enzymatische Reaktionen, wie z.B. die DNA-Sequenzierung, erfolgte mit Hilfe des Nucleospin® Plasmid-Kits (Fa. Macherey und Nagel) gemäß dem Hersteller-Protokoll. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit NaOH/SDS (Sambrook *et al.*, 1989). Das anionische Detergenz SDS zerstört die Zellwand, wohingegen NaOH die DNA denaturiert. Nach Neutralisation mit



Kaliumacetat-Lösung fallen Proteine, SDS und die Zelltrümmer aus, die durch Zentrifugation sedimentiert werden. Mit dem Überstand wird ein Nucleospin-Säulchen beladen. Anschließend wird zentrifugiert. Unter den herrschenden Salzkonzentrationen bindet Plasmid-DNA an die Silica-Membran. Störende Kontaminanten werden durch Waschen mit ethanolischem Puffer entfernt. Die hochreine Plasmid-DNA wird mit Elutionspuffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  eluiert und wie unter 2.10.4 beschrieben quantifiziert.

Unter Berücksichtigung der vom Hersteller empfohlenen Abwandlungen des Standard-Protokolls ist mit Hilfe dieses „Kits“ auch die Präparation von Cosmid-DNA möglich.

#### **2.8.4 Präparation von Cosmid-DNA**

Zur Präparation größerer Mengen Cosmid-DNA wurde das Nucleobond® AX Kit der Fa. Macherey und Nagel verwendet. Das der Reinigung zugrunde liegende Prinzip stimmt mit demjenigen der Minipräparation überein. Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

### **2.9 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten**

Mit dieser Methode (Sambrook *et al.*, 1989) können DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe in einer Gelmatrix aus Agarose durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Die Laufstrecke linearer Doppelstrang-DNA ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Je nach verwendeter Agarosekonzentration (zwischen 0,4 und 1,2 % w/v) lassen sich DNA-Fragmente zwischen 0,1 und 20 kb trennen.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTAE-Puffer (siehe Tabelle 2.3) resuspendiert und durch Aufkochen vollständig gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde die Agaroselösung in einen mit Probenkamm versehenen Gelschlitten gegossen. Anschließend wurde 1 % Ethidiumbromid-Lösung (siehe Tabelle 2.1) bis zu einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml zugesetzt und gleichmäßig verteilt. Nach dem Gelieren der Agaroselösung wurde der Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, mit 1xTAE-Puffer überschichtet und der

Probenkamm entnommen. Die DNA-Proben wurden mit 0,15 VT 6fach DNA-Auftragspuffer (siehe Tabelle 2.3) versetzt und in die Probentaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1-5 V/cm Elektrodenabstand. Mit Hilfe der im Auftragspuffer enthaltenen Farbstoffe konnte der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden. Die Detektion erfolgte mit einem Transilluminator bei 312 nm, wobei die elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente durch die Interkalation des Farbstoffs Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt wurden. Falls erforderlich, wurde die Trennung fotografisch dokumentiert. Über den Vergleich mit einem DNA-Größenstandard („1kb DNA-Ladder“ oder „100 bp DNA-Ladder“, siehe Tabelle 2.2) wurden die Fragmentgrößen bestimmt.

### **2.9.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das NucleonSpin®Extract-Kit der Fa. Macherey und Nagel verwendet. Das im UV-Licht sichtbare DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert.

## **2.10 Reinigung, Konzentrierung, und Quantifizierung von DNA**

### **2.10.1 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion ist eine Methode zur Abtrennung von Verunreinigungen (meist Proteinen) aus nukleinsäurehaltigen Lösungen.

Das Volumen der Probe wurde mit TE-Puffer (siehe Tabelle 2.3) auf mindestens 50 µl vergrößert, mit 1 VT Phenol/Chloroform-Gemisch (siehe Tabelle 2.1) versetzt und gründlich gemischt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch eine anschließende Alkoholfällung wurden verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt.

### 2.10.2 Fällung von DNA

Die Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen wurde zum Reinigen, Konzentrieren oder Umpuffern durchgeführt.

Nach Zusatz von 2,5 VT absolutem Ethanol und 0,1 VT 3 M Natriumacetat-Lösung (pH: 5,2, siehe Tabelle 2.3) wurde der Ansatz 60 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm wurde die DNA sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die DNA 3 min lang mit Hilfe einer Speedvac getrocknet. Abschließend wurde die DNA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  oder TE-Puffer gelöst.

### 2.10.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup> Extract „Kits“

Hydrolisierte Vektoren oder spezifische PCR-Produkte wurden direkt mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup> Extract „Kits“ der Fa. Macherey und Nagel gereinigt. Zur Abtrennung von weiteren durch Restriktion entstandenen Fragmenten oder unspezifischen PCR-Produkten wurde zunächst eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde die Zielbande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen gemäß Hersteller-Protokoll.

### 2.10.4 Quantitative Bestimmung von DNA

Die Gehaltsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch durch Messen der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Nach (Sambrook *et al.*, 1989) entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  doppelsträngiger DNA/ml. Der Quotient aus  $A_{260}/A_{280}$  beschreibt die Reinheit der präparierten DNA. Bei einer reinen Isolation beträgt der Quotient 1,8. Verunreinigungen wie z.B. Phenol oder Proteine, die bei 280 nm absorbieren, erniedrigen den Quotienten.

## **2.11 Enzymatische Manipulation von DNA**

### **2.11.1 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom TYP II verwendet. Dazu wurden 500 bis 1000 ng DNA in 50  $\mu$ l Endvolumen in Anwesenheit von 1 U des entsprechenden Enzyms für 2-4 h bei der optimalen Temperatur inkubiert (im Normalfall 37°C). Dabei wurde dem Restriktionsansatz 0,1 VT bezogen auf das Endvolumen des vom Hersteller empfohlenen 10fach Reaktionspuffers zugesetzt. Die gleichzeitige Hydrolyse mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde in dem Puffer durchgeführt, in dem beide Enzyme die höchste Aktivität zeigten. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Enzyme wenn möglich hitzeinaktiviert. Bei RNA-haltigen DNA-Präparationen, wie sie mit Hilfe der „boiling method“ erhalten wurde, wurde den Ansätzen 1  $\mu$ l RNase-Lösung (0,1 %; siehe Tabelle 2.3) zugesetzt.

### **2.11.2 Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zur Erzeugung glatter DNA-Enden**

Durch proteolytische Spaltung der *E. coli* DNA-Polymerase I entsteht das Klenow-Fragment. Dessen 3'→5' Polymeraseaktivität wurde zum Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen als Voraussetzung für nachfolgende glattendige Ligationen benutzt. Das wie unter 2.10.3 beschrieben aufgereinigte DNA-Fragment wurde mit 0,1 VT des Reaktionspuffers (bezogen auf das Endvolumen) der Auffüllreaktion gemischt und mit 33  $\mu$ M pro dNTP supplementiert. Pro  $\mu$ g DNA wurde 1 U Klenow Fragment zugegeben und 15 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM und 10 minütiges Inkubieren bei 75°C gestoppt. Das modifizierte DNA-Fragment wurde wie unter 2.10.3 beschrieben gereinigt und glattendig ligiert.

### 2.11.3 Dephosphorylierung von DNA

Um bei Klonierungen die Religation glattendiger oder einfach hydrolysierter Vektoren zu unterbinden, wurden die 5'-Phosphatreste durch Inkubation mit alkalischer Shrimp Phosphatase (SAP, shrimp alkaline phosphatase) der Fa. NEB entfernt. Die SAP lässt sich gegenüber der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, calf intestine alkaline phosphatase) leicht durch Erhitzen irreversibel inaktivieren.

Nach Aufreinigung (siehe 2.10.3) wurde die Vektor-DNA in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst und mit 0,1 VT des SAP-Puffers bezogen auf das Endvolumen der Reaktion versetzt. Anschließend wurde 1 U SAP zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend 15 min bei 65°C inkubiert. Das modifizierte DNA-Fragment wurde wie unter 2.10.3 beschrieben gereinigt und für die Ligation eingesetzt (siehe 2.11.5).

### 2.11.4 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte wie unter 2.13.2 beschrieben.

### 2.11.5 Standard-Ligationsverfahren von DNA mit glatten oder kohäsiven Enden

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen. Dabei wird unter ATP-Verbrauch eine kovalente Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen und der 3'-OH-Gruppe eines weiteren DNA-Fragmentes gebildet.

Sowohl Vektor- als auch Insert-DNA wurden wie unter 2.10.3 beschrieben gereinigt und wie unter 2.10.4. beschrieben quantifiziert.

Der Standard Ligationsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

Vektor-DNA	25 ng
Insert-DNA	3 facher molarer Überschuss
T4 DNA-Ligasepuffer	0,1 VT
T4 DNA Ligase	1 U
H <sub>2</sub> O	Ad 20 µl

Der Ligationsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Zur Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 2-4 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

## **2.12 Transformation von *E. coli***

### **2.12.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen**

Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll von (Shigekawa & Dower, 1988). Aus einer Vorkultur wurde die Hauptkultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 4 000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml eisgekühltem 10 % Glycerin resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Zellen mit 25 ml 10 % Glycerin gewaschen und für 10 min bei 4°C und 4 000 rpm sedimentiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 3 ml GYT-Puffer (siehe Tabelle 2.3) aufgenommen und in 50 µl Fraktionen aliquotiert. Die Portionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später bei –80°C gelagert.

### **2.12.2 Elektroporation von *E. coli***

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-4 µl des jeweiligen Ligationsansatzes in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) gemischt. Die Elektroporation wurde bei einem Widerstand von 200 Ω , einer Kapazität von 25 µF und einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt. Die Zeitkonstante sollten mehr als 4 ms betragen. Direkt nach der Elektroporation wurden 500 µl LB-Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur phänotypischen Expression 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz entsprechend der vektorvermittelten Resistenz auf antibiotikahaltigen Agarplatten (siehe Tabelle 2.10) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

Zur Bestimmung der Elektrokompentenz einer Charge Zellen wurde 1 ng pUC18-DNA wie oben beschrieben zur Transformation eingesetzt. Die erhaltenen Kolonien wurden ausgezählt und die Kompetenz nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000 = [\text{Transformanten}/\mu\text{g DNA}]$$

Die Kompetenz der verwendeten Zellen lag mindestens bei  $1 \times 10^8$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  DNA.

### 2.12.3 Kontrolle der Klonierung mit Hilfe der $\alpha$ -Komplementation

*E.coli*-Stämme, die den Genotypen *lacZ* $\Delta$ M15 besitzen wie z. B. *E.coli*-XL-1-Blue, bieten bei gleichzeitiger Verwendung eines Klonierungsvektors, der für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert (z. B. pBluescript<sup>®</sup>IIS(-) oder pUC18), die Möglichkeit zur  $\alpha$ -Komplementation. Ausgehend vom Chromosom wird das  $\omega$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, wohingegen das  $\alpha$ -Fragment vektorkodiert vorliegt. Zusammen bilden beide Proteine aktive  $\beta$ -Galaktosidase, die in der Lage ist, die Farbstoffvorstufe X-Gal zu einem blauen Farbstoff umzusetzen. Ist der für das  $\alpha$ -Fragment kodierende Leserahmen jedoch durch das einklonierte DNA-Fragment unterbrochen, kann keine aktive  $\beta$ -Galaktosidase mehr gebildet werden. Die entsprechenden Kolonien sind weiß.

Die transformierten Zellen wurden auf Agarplatten mit 0,08 mg X-Gal /ml ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei Verwendung von Stämmen, die das *lacI*-Gen enthalten, wurde zusätzlich IPTG 0,2 mM in die Platten eingegossen. Das *lacI*-Gen kodiert für den Lac-Repressor, der die Transkription des *lacZ*-Gens blockiert. Lediglich weißgefärbte Kolonien wurden in Flüssigkultur überimpft und nach Plasmidpräparation einer Restriktionsanalyse unterzogen (wie unter 2.8.2 und 2.11.1 beschrieben).

## 2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode mit der spezifisch DNA-Abschnitte *in vitro* vermehrt werden können. Durch die zyklische Wiederholung von drei Einzelschritten wird der von zwei Oligonukleotiden begrenzte Bereich amplifiziert.

1. Denaturierung: Durch Erhitzen auf 95°C bis 98°C wird doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge getrennt.
2. Annealing: Die Temperatur wird auf 50°C bis 62°C gesenkt, dabei lagern sich die Primer an die komplementären Abschnitte der einzelsträngigen Matrizen-DNA an.
3. Extension: Bei 72°C erfolgt ausgehend von den Primern in 5'→3'Richtung die Synthese des Komplementärstranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

### 2.13.1 Reaktionsbedingungen

#### 2.13.1.1 Auswahl der thermostabilen DNA-Polymerase

Es sind verschiedene thermostabile DNA Polymerasen kommerziell erhältlich, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden.

Die *Taq* DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* liefert hohe Ausbeuten bei schneller Syntheseleistung (1 kb/ 0,5 min) zeigt aber die höchste Fehlerrate ( $2 \times 10^{-5}$ ). Die aus *Pyrococcus furiosus* isolierte *Pfu* DNA Polymerase besitzt zusätzlich eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität. Aufgrund dieser Korrekturlese-Funktion ist die Fehlerrate um den Faktor 10 geringer. Die Syntheserate sinkt jedoch auf 1 kb/ 1 min. Die mit *Pfu* DNA Polymerase generierten PCR-Produkte sind glattendig, während mit *Taq* DNA Polymerase amplifizierte PCR-Produkte unabhängig von der Matrizen-DNA am 3'-Ende einen A-Überhang tragen. Dies wurde bei der Ligation mit Vektoren aus der pTOPO-Familie der Fa. Invitrogen ausgenutzt. Das Expand™ High Fidelity PCR System der Fa. Boehringer Mannheim ist eine Mischung aus *Taq* DNA und *Pwo* DNA Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*) und vereint die Vorteile der



beiden einzelnen Polymerasen (hohe Syntheseleistung bei geringer Fehlerrate). Diese Polymerase-Mischung eignete sich erfahrungsgemäß am besten, wenn genomische DNA als Matrize diente.

### 2.13.1.2 Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit einem Thermoblock in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Volumen	Komponente	Endkonzentration
X µl	Template-DNA:	
	Plasmid- oder Cosmid-DNA	10 pg/µl
	Genomische DNA	10 ng/µl
4 µl	dNTPs-Mix (1,25 mM pro dNTP))	200 µM pro dNTP
2,5 µl	10fach Puffer	1fach
0,75µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
0,25 µl	Forward-Primer (50 pmol/µl)	0,5 µM
0,25 µl	Reverse-Primer (50 pmol/µl)	0,5 µM
1,25 µl	DMSO (100 %)	5 %
0,2 µl	DNA-Polymerase	1 U
Ad 25 µl	H <sub>2</sub> O	

Um die Bildung unspezifischer Amplifikate zu vermeiden, erfolgte die Zugabe der DNA Polymerase immer nach dem initialen Denaturierungsschritt (95°C, 5 min). Der Zusatz von DMSO erleichtert die Denaturierung von GC-reicher DNA, reduziert aber die 3'→5'Exonuklease-Aktivität. Sollten die Amplifikate für Expressionversuche oder gerichtete Mutagenesen eingesetzt werden, wurde über einen Gradienten die niedrigste DMSO-Konzentration ermittelt, die eine Amplifikation erlaubte.

### 2.13.1.3 Standard PCR-Programm

Zunächst wurde das folgende PCR-Programm durchgeführt. Konnte unter diesen Bedingungen kein Amplifikat der gewünschten Größe erhalten werden, wurden Variationen getestet.

initiale Denaturierung	95°C	5 min
	Zugabe der DNA-Polymerase	
Annealing	55-62°C	30 s
Extension	72°C	0,1 bis 5 min
Denaturierung	95°C	30 s
	30 Zyklen	
Finale Extension	72°C	10 min
	16°C	bis zur Probenentnahme

Um eine vollständige Denaturierung GC-reicher DNA zu gewährleisten, wurde initial für 5 min bei 95-98°C denaturiert. Alle folgenden Denaturierungsschritte wurden auf 30 s begrenzt.

Beim „Primerdesign“ wurde eine theoretische Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von 50-60°C angestrebt. Diese wurde näherungsweise mit der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G oder C}) + 2 \times (\text{Anzahl A oder T})$$

Die optimale Annealingtemperatur wurde letztlich durch einen Temperaturgradienten ermittelt. Die Größe des erwarteten PCR-Produktes und die verwendete DNA-Polymerase (s. oben) bestimmten die Länge des Extensionsschrittes. Um den Anteil unvollständig amplifizierter PCR-Produkte zu minimieren, wurde eine finale Extension von 10 min durchgeführt.

Wurde bei der Amplifikation ein spezifisches PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten, konnte dieses direkt mit Hilfe des Nucleospin® Extract Kits der Fa. Macherey und Nagel gereinigt werden. Lieferte die PCR außer dem Zielfragment auch unspezifische Amplifikate, wurde der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Zielbande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert (siehe 2.10.3). Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen gemäß Hersteller-Protokoll.

### 2.13.2 Klonierung von PCR-Produkten unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kits

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit der Fa. Invitrogen durchgeführt. Mit der *Taq* DNA Polymerase erzeugte PCR-Produkte wurden direkt kloniert. Mit der *Pfu* Polymerase bzw. dem Expand High Fidelity PCR System erhaltene Amplifikate wurden nachträglich mit der *Taq* DNA Polymerase inkubiert, um diese mit einem 3'-A-Überhang zu versehen.

Die Funktionsweise des „Kits“ basiert auf folgendem Prinzip:

Der templateunabhängig mit *Taq* DNA Polymerase erzeugte 3'-A-Überhang der Amplifikate wird zusammen mit dem 3'-T-Überhang des pCR®2.1-TOPO Vektors (Shuman, 1991; Shuman, 1994) für eine der Ligation analogen Reaktion ausgenutzt. Das 3'-Ende des Vektors ist über einen Phosphatrest kovalent mit der Topoisomerase I verbunden (aktivierter Vektor). Diese katalysiert den nukleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe des Primers an den 3'-Phosphatrest des Vektors. Unter Ausbildung eines neuen Phosphodiesters werden PCR-Produkt und Vektor verbunden. Die Topoisomerase I wird bei dieser Ligation freigesetzt.

Bei der Durchführung wurde das Protokoll des Herstellers eingehalten.

Nach fünfminütiger Ligation wurden *E. coli* TOP10 Zellen mit Hilfe eines Hitze-Schocks transformiert. Zur phänotypischen Expression wurde 1 h bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf Selektivagarplatten mit X-Gal-Zusatz (siehe Tabelle 2.3) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.14 DNA Hybridisierungen

### 2.14.1 Herstellung von DNA-Sonden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes

Die Markierung von Gensonden erfolgte mit Hilfe des „Dig-High-Prime-Mix“ der Fa. Roche Diagnostics. Der Mix enthält dATP, dCTP, dGTP je 1 mM, 0,65 mM TTP, 0,35 mM Dig-dUTP, 1 U/μl Klenow Fragment und Hexanukleotide, die statistisch binden. Deshalb wird diese Methode als „random primed DNA labeling reaction“ bezeichnet. Nach der Denaturierung binden die Hexanukleotide an die Matrizen-DNA

und dienen als Startpunkte für die Zweitstrangsynthese durch das Klenow Fragment. Dabei werden außer den natürlichen Substraten auch DIG-markierte Nukleotide inkorporiert.

Nach Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das zu markierende Fragment wie unter 2.10.3 beschrieben aus dem Agarosegel extrahiert. 200 ng DNA wurden durch 10 minütiges Kochen denaturiert, direkt auf Eis gekühlt und mit 4 µl des Dig-High-Prime-Mixes versetzt. Anschließend wurde die Markierungsreaktion über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion und gleichzeitiger Denaturierung der Sonde wurde erneut 10 min gekocht und die Gensonde der Hybridisierungslösung zugesetzt.

### **2.14.2 Southern Blot**

5 µg genomische DNA bzw. 500 ng Cosmid-DNA wurden wie unter 2.11.1 und 2.9 beschrieben hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA gemäß dem Protokoll von (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde die im Agarosegel eingeschlossene DNA durch Behandlung mit Denaturierungspuffer (2 x 15 min) in ihre Einzelstränge getrennt. Nach kurzem Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> wurde der pH-Wert des Gels durch Schwenken im Neutralisierungspuffer (2 x 15 min) in den neutralen Bereich gebracht. Anschließend wurde die DNA auf die Nylonmembran transferiert. Das Gel wurde dazu mit seiner Oberseite nach unten auf zwei Lagen Whatman-Papier, die mit ihren Enden in ein 20 x SSC-Pufferreservoir reichten, platziert. Auf die Rückseite des Gels wurde eine Nylonmembran in Gelgröße gelegt, die mit zwei Lagen Whatman-Papier und einem 5 cm hohen Stapel Einmalhandtücher bedeckt wurde. Durch das Auflegen eines 1 kg schweren Gewichtes wurde der für den Transfer nötige Druck erzeugt. Der Kapillarblot der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht. Durch 5-10 minütige Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm wurde die DNA auf der Membran fixiert.

### 2.14.3 Hybridisierung und Detektion mit Hilfe des DIG-Systems

Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll der Fa. Roche Diagnostics. Die mit DNA beladene Nylonmembran wurde mit Hybridisierungslösung (20 ml/ 100cm<sup>2</sup> ; siehe Tabelle 2.5) bei 42°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert (Vorhybridisierung). Nach 2 h wurde die Hybridisierungslösung durch frisch denaturierte Sondenlösung ersetzt und die Hybridisierung über Nacht bei 42°C durchgeführt. Nicht hybridisierte und unspezifisch gebundene Sonden-DNA wurde durch einen Waschschrift bei RT mit 2 x Waschlösung (siehe Tabelle 2.5) und zwei Waschschriffe bei 68°C mit 0,5 x Waschlösung (siehe Tabelle 2.5) entfernt. Nach fünfminütigem Äquilibrieren in Maleinsäurepuffer, der Behandlung mit 2 x Blockierungslösung (30 min, RT, siehe Tabelle 2.5), der Behandlung mit der Anti-DIG-AP-Konjugationslösung (30 min, RT) und Waschen mit Waschpuffer (2 x 20 min, RT, siehe Tabelle 2.5) wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer geschwenkt. Anschließend wurde der Filter mit unverdünnter CSPD-Lösung inkubiert und in Folie eingeschweißt. Zum Starten der Chemolumineszenz-Reaktion wurde die Membran 15 min bei 37°C inkubiert und 2 bis 6 h auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit Hilfe einer Entwicklermaschine.

## 2.15 Genetische Manipulation von *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1

Zur Erzeugung von merodiploiden Mutanten wurde *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit einem pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO-Derivat transformiert. Um über eine zweifache homologe Rekombination markerlose Mutationen zu erzeugen, wurde *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit einem pSWU41-Derivat transformiert. Die Transformation wurde nach dem Protokoll von (Beyer *et al.*, 1999) durchgeführt, das auf einer Selektion mit Kanamycin beruht.

### 2.15.1 Herstellung elektrokompeter Zellen

Elektrokompeter Myxobakterien-Zellen wurden bei Bedarf frisch hergestellt. Eine 200 ml-Tryptonkultur (120 µg Streptomycin/ml, siehe Tabelle 2.10) von *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde bis zum Erreichen einer Zelldichte von 1,6 bis 2,0 x 10<sup>8</sup>

Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden für 15 min bei 20°C und 5000 rpm geerntet und im gleichen Volumen HEPES-Puffer (siehe Tabelle 2.3) gründlich resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Zellpellet im halben Puffervolumen aufgenommen und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde eine Zellsuspension mit  $6,8 \times 10^{10}$  Zellen/ml hergestellt.

### **2.15.2 Elektroporation**

Von der, wie unter 2.8.3 beschrieben, präparierten Plasmid-DNA wurden 5 µl (entspricht ca. 1 µg) mit 40 µl der Suspension elektrokompeter Zellen gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1 cm) überführt. Die Elektroporation wurde bei 200 Ω, 25 µF und 0,85 kV/cm durchgeführt. Die erhaltenen Zeitkonstanten lagen zwischen 4,1 und 4,5 ms. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml Tryptonmedium zugegeben. Zur phänotypischen Expression wurde die Zellsuspension in 50 ml Medium überführt und 18-22 h bei 30°C inkubiert.

### **2.15.3 Weichagarplattierung**

Die Zellen wurden für 15 min bei 20°C und 5000 rpm pelletiert und anschließend in 2 ml Tryptonmedium suspendiert. Verschiedene Volumina dieser Suspension wurden mit 3 ml Weichagar (120 µg Streptomycin/ml und 50 µg Kanamycin/ml) gemischt und auf Tryptonagarplatten (120 µg Streptomycin /ml und 50 µg Kanamycin/ml) ausgebracht. Nach Erstarren des Weichagars erfolgte die Inkubation bei 30°C. Nach zehn bis vierzehn Tagen wurden die Transformanten in 10 ml Tryptonmedium mit Kanamycinzusatz überführt und bei 30°C kultiviert. Das Kulturvolumen konnte nach 48 h Inkubation auf 50 ml erhöht werden. Die erhaltenen Merodiploiden wurden genotypisch durch Southern Blot Analyse (siehe 2.14.2) verifiziert und mit Hilfe der HPLC phänotypisch analysiert (siehe 2.20).

#### **2.15.4 Erzeugung von markerlosen Mutationen über zweifache homologe Rekombination**

Eine genotypisch korrekte merodiploide Mutante wurde 10 bis 14 Tage in Abwesenheit von Kanamycin passagiert. Dabei wurde alle 48 h 1:50 überimpft. Dann wurde eine Verdünnungsreihe mit  $2,5 \times 10^6$  bis  $2,5 \times 10^8$  Zellen auf Trypton-Festmedium mit Zusatz von 5 % Saccharose plattiert. Der verwendete Vektor pSWU41 (Wu & Kaiser, 1996) enthält das *sacB* Gen, dessen Genprodukt Saccharose in einen zelltoxischen Metaboliten umwandelt. Unter diesen Bedingungen sollten nur Klone wachsen, welche das Kointegrat verloren hatten. Nach ca. 12 Tagen Inkubation waren die ersten Einzelkolonien sichtbar. Diese wurden in 3 ml Tryptonmedium überführt und für 72 h propagiert. 70 µl der erhaltenen Kulturen wurden auf Tryptonagarplatten mit 5 % Saccharose aufgetropft. In einer zweiten Reihe wurde die Suspension auf Tryptonagarplatten (50 µg Kanamycin/ml) aufgetropft. Wachstum konnte nach 72 h Inkubation beobachtet werden. Klone, die eindeutig Kanamycin-sensitiv und Saccharose-resistent waren, wurden genotypisch und phänotypisch charakterisiert (siehe 2.14.2 und 2.20).

#### **2.16 Konstruktion einer Cosmidgenbank von *Melittangium lichenicola* Me l46**

Diese Technik dient der Klonierung genomischer DNA in Fragmenten von 30 bis 45 kb in einen Cosmid-Vektor (Sambrook *et al.*, 1989).

##### **2.16.1 Behandlung der genomischen DNA**

Die genomische DNA von *M. lichenicola* Me l46 wurde nach 2.8.1 präpariert und mit der Restriktionsendonuklease *Sau3A* wie folgt partiell hydrolysiert. Für den enzymlimitierten Partialverdau wurden 1 µg DNA mit folgenden Enzymmengen 1 U, 0,5 U, 0,25 U, 0,125 U, 0,0625 U, 0,03125 U und 0,015625 U 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme eines Aliquots für die Gelelektrophorese wurden die Restriktionsansätze sofort bei -20°C eingefroren. Die Ansätze, welche in der Agarosegelelektrophorese eine durchschnittliche Fragmentgröße zwischen 35 und

45 kb zeigten, wurden vereint und einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die partiell hydrolysierte DNA wurde wie unter 2.10.2 angegeben gefällt und wie unter 2.11.3 beschrieben mit alkalischer Shrimp-Phosphatase dephosphoryliert. Die wässrige Phase der erneuten Phenol/Chloroform-Extraktion wurde für die Copräzipitation mit der Vektor-DNA (siehe 2.16.2) eingesetzt.

### **2.16.2 Manipulation des Cosmid-Vektors SuperCos I**

Der Vektor SuperCos I diente als Klonierungsvektor für die *Sau3A* hydrolysierte DNA.

10 µg Vektor-DNA wurden mit *Xba*I hydrolysiert, gelelektrophoretisch analysiert und mit Hilfe einer „Microspin Column“ entsalzt. Der linearisierte Vektor wurde wie unter 2.11.3 beschrieben mit SAP dephosphoryliert. Zur Enzyminaktivierung wurde 25 Minuten bei 75°C inkubiert. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA wie unter 2.10.2 beschrieben gefällt. Anschließend wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI hydrolysiert. Die wässrige Phase der anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion wurde mit der Insert-DNA (siehe 2.16.1) vereint und gemeinsam gefällt. Das Copräzipitat aus Insert- und Vektor-DNA wurde in 15 µl H<sub>2</sub>O gelöst und 40 h bei 16°C ligiert. Um das bei der Verpackungsreaktion störende Polyethylenglykol zu entfernen wurde die DNA erneut gefällt.

Zur *in vitro* Verpackung der Cosmide in Phagenköpfe wurde der Gigapack® III Gold Packaging Extract der Fa. Stratagene verwendet. Der Verpackungsextrakt wurde zügig aufgetaut und mit 4 µl des Ligationsansatzes gemischt. Nach einer Inkubation von 1,5 h bei RT wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben. Anschließend wurde kurz zentrifugiert, der Überstand entnommen und bei 4°C gelagert.

Für *S. aurantiaca* DW4/3-1 (den Myxothiazol-Produzenten) wurde eine Genomgröße von 9,35 Mbp ermittelt (Neumann *et al.*, 1992). Um die Abdeckung des Genoms von *M. lichenicola* Me I46 (den Melithiazol-Produzenten) durch die Cosmidgenbank zu berechnen, wurde deshalb eine Genomgröße von 10 Mbp angenommen. Die Cosmidgenbank sollte ca. 2000 Klone umfassen, was bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 40 kb einer achtfachen Abdeckung des Genoms entspricht. Um die gewünschte Anzahl an Klonen zu erhalten, wurde zunächst die Effizienz der



Verpackungsreaktion und der Infektion (der sogenannte Titer) bestimmt. Dazu wurde *E. coli* SURE® (siehe Tab Tabelle 2.12) in LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % Maltose (w/v) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 kultiviert. Von dieser Kultur wurden zur Infektion 25 µl mit je 1 µl und 2,5 µl der Verpackung gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Infektion wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und die Ansätze 1 h bei 37°C phänotypisch exprimiert. Anschließend wurde auf LB-Agarplatten mit 50 µg Ampicillin/ml ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Auszählen der Kolonien wurde der Titer bestimmt.

Das für die Bildung von 2000 Kolonien nötige Volumen der Verpackungsreaktion wurde mit SM-Puffer auf 1250 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen einer Zellsuspension von *E. coli* SURE® (OD<sub>600</sub> von 0,6; Anzuchtbedingungen siehe oben) vermischt. Die Infektion erfolgte für 30 min bei 37°C. Nach Zugabe von 4 VT LB-Medium wurde 1 h bei 30°C phänotypisch exprimiert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Agarplatten mit 50 µg Ampicillin/ml (22 cm x 22 cm großen NUNC-Schalen der Fa. Nalgene) ausplattiert. Um Rekombinationsereignisse in den Cosmiden zu vermeiden, wurde bei 33°C über Nacht im Hybridisierungsöfen inkubiert.

1920 Kolonien wurden mit Hilfe eines Roboters in der Abteilung Genomanalyse in Mikrotiterplatten mit 130 µl LB-Medium (50 µg Ampicillin/ml) gepickt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien auf ampicillinhaltige Agarplatten (4 NUNC-Schalen, s. oben) repliziert und 20 h bei 30°C inkubiert. Die Kulturen wurden mit 100 µl 50 % Glycerin gemischt und bei –80°C eingelagert. Die Agarplatten wurden für ein Screening mit Hilfe einer Koloniehybridisierung eingesetzt.

### **2.16.3 Koloniehybridisierung**

### **2.16.4 Transfer der Kolonien (“Abklatsch“)**

Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll der Fa. Roche Diagnostics. Die Agarplatten wurden für 2 h bei 4°C vorgekühlt. Die Nylonmembranen wurden auf den Agarplatten platziert und nach einer Transferzeit von 1 min kurz auf 2 Lagen

trockenem Whatman-Papier geblottet. Zur Zellysis wurden die Filter für 15 min auf 2 Lagen mit Denaturierungslösung (siehe Tabelle 2.5) getränktem Whatman-Papier inkubiert. Die Neutralisation und die Behandlung mit 2 x SSC (siehe Tabelle 2.5) wurde in gleicher Weise vorgenommen. Zum Fixieren der DNA wurden die Nylonmembranen 30 min bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde auf die einer Mikrotiterplatte entsprechende Fläche 1 ml Proteinase K-Lösung (2 mg/ml, siehe Tabelle 2.5) aufgetropft. Die Membranen wurden in Aluminium-Folie verpackt und 1 h bei 37°C inkubiert. Durch vorsichtiges Abreiben mit Filterpapier wurden die Zelltrümmer entfernt. Die in dieser Weise behandelten Membranen wurden für Hybridisierungsexperimente eingesetzt (siehe 2.14.3).

## **2.17 Screening der Cosmidgenbank mit Hilfe der PCR**

100 µl Kultur von jeweils 16 Klonen der Cosmidgenbank wurden zu einem „Cosmid-Pool“ zusammengefasst. Aus den resultierenden 120 Pools wurde wie unter 2.8.3 beschrieben die Cosmid-DNA isoliert und als Matrize für die PCR-Analyse eingesetzt. Mit den Einzelcosmiden der „Cosmid-Pools“, von denen als Matrize ein PCR-Amplifikat der erwarteten Größe erzeugt werden konnte, wurde eine weitere PCR unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

## **2.18 Computergestützte Analyse von DNA-Sequenzen**

Durch DNA-Sequenzierung erhaltene Daten wurden mit Hilfe des Programmpaketes „DNASTAR“ der Fa. DNASTAR ausgewertet. Der Vergleich und die Auswertung von Sequenzrohdaten wurde mit dem Programm „Seqman“ durchgeführt. Restriktionskartierungen wurden mit dem Programm „MapDraw“ erstellt. Die Eingabe, das Bearbeiten und die *in silico* Translation von DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms „EditSeq“. Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene wurden mit dem Programm „MegAlign“ durchgeführt.

Zusätzlich wurden für Sequenzvergleiche und Homologiesuchen über das Internet zugängliche Programme genutzt, deren Internet-Adressen im folgenden aufgeführt sind:

„NCBI“ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

---

„Clustal W“	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
„Frame plot“	<a href="http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl">http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl</a>
„FASTA“	<a href="http://www.ebi.ac.uk/fasta33/">http://www.ebi.ac.uk/fasta33/</a>

## **2.19 Enzymologische Untersuchungen**

### **2.19.1 Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte**

Der entsprechende Bakterienstamm wurde wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben kultiviert. 20 ml der Kultur wurden zur Zellernte eingesetzt.

Um nachzuweisen, ob exprimierte Proteine in löslicher Form vorlagen, wurden die Zellen aufgeschlossen. Das Zellsediment wurde in 800 µl Säulen- und Lysis-Puffer (siehe Tabelle 2.6) aufgenommen. Die Beschallung der Zellen erfolgte mit dem Ultraschallgerät vom Typ Bandolin Sonopuls der Fa Omnilab bei 17 %iger Stärke, 10 Impulsen und 3 Wiederholungen. Kam es in der Bakteriensuspension zu einer Schaumbildung, wurde die Leistung des Gerätes reduziert. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C sedimentiert. Aus dem Überstand wurden 50 µl entnommen und bis zur Untersuchung mittels SDS-PAGE bei –20 °C gelagert (lösliche Extrakte). Die Menge an Probenpuffer (siehe Tabelle 2.1), die zugegeben werden musste, hing von der Proteinkonzentration der Probe ab (siehe 2.19.2).

### **2.19.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „Protein Assay“ der Fa. Biorad (siehe Tabelle 2.1.) Die Methode basiert auf Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung nach der Bindung des Farbstoffes an ein Protein, von 465 nm auf 595 nm,. Dieser Zusammenhang wurde erstmals von Bradford demonstriert (Bradford, 1976).

Die Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Microassay Procedure, Instruction Manual, Biorad). Die Erstellung der Eichgeraden erfolgte mit Hilfe des mitgelieferten Rinderserumalbumins.

### 2.19.3 Pufferaustausch bzw. Konzentrierung von Proteinextrakten

Zur Konzentrierung, Entsalzung und zum Austausch des Puffers wurden Konzentratoren der Fa. Amicon eingesetzt. Volumina bis 500 µl wurden mit Hilfe der „Microcon™ Microkonzentratoren“ mit einer Ausschlussgröße von 3000 Da ultrafiltriert. Bei größeren Volumina wurden „Centriplus™-Konzentratoren“ eingesetzt. Die Durchführung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.19.4 Reinigung chitinbindender Intein-Fusionsproteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie

Zur Reinigung rekombinanter Proteine wurde das IMPACT One-Step Protein Purification System der Fa. NEB verwendet. Bestandteil dieses „Kits“ sind verschiedene Vektoren, die die Expression von chitinbindenden Intein-Fusionsproteinen ermöglichen. Diese Expressionsvektoren der pCYB-Familie enthalten das *bla*- und das *lacI*-Gen. Das *bla*-Gen dient bei der Klonierung als Selektionsmarker, das *lacI*-Gen kodiert für den Lac-Repressor. Die Expression des Fusionsgens steht unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren  $P_{tac}$ -Promotors.  $P_{tac}$  ist ein sogenannter Hybrid-Promotor, der aus der –10-Region des *lac*- und der –35-Region des *trp*-Promotors konstruiert ist.

Das für das gewünschte Protein kodierende Gene, wird so in den Polylinker kloniert, dass es sich mit den Abschnitten, die für den Inteinanteil und die Chitinbindedomäne kodieren, in einem Leserahmen befindet. In Abhängigkeit von der für die Klonierung benutzten Restriktionsschnittstelle des Polylinkers werden die exprimierten Proteine am C-Terminus um einige Aminosäuren verlängert. Nach der Induktion mit IPTG erfolgt ausgehend vom  $P_{tac}$ -Promotor die Transkription. Bei der späteren Translation wird das Zielprotein an seinem C-Terminus mit einem Intein fusioniert. Dieses Intein ist so modifiziert, dass es in Gegenwart von Sulfhydrylgruppen (wie z.B. 1,4-Dithiothreitol (DTT)) bei niedrigen Temperaturen an seinem N-Terminus eine Spaltungsreaktion katalysiert. Der C-Terminus des Inteins ist mit einer 5 kDa großen Chitinbindedomäne fusioniert.

## **Prinzip der Affinitätschromatographie**

Über die Chitinbindedomäne lagert sich das Fusionsprotein an die Chitinmatrix an. Beim anschließenden Spülen werden theoretisch alle übrigen Proteine abgetrennt. Nach dem vom Inteinanteil katalysierten Acylshift wird der entstandene Thioester durch Inkubation mit DTT gespalten. Anschließend kann das hochreine Zielprotein eluiert werden.

## **Durchführung**

Als chromatographische Säulen dienten leere PD-10 Hülzen, die mit 3 ml Chitin-Beads (siehe Tabelle 2.1) mit einer Bindungskapazität von 2 mg/ml gepackt und durch Spülen mit 30 ml Säulen- und Zellysis-Puffer (10faches Säulenvolumen) äquiliert wurden. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde der zellfreie Proteinextrakt auf die Säule aufgetragen. Durch Waschen mit dem 15fachen Säulenvolumen wurden nicht bindende Proteine entfernt. Die Spaltung des Fusionsproteins wurde durch Spülen mit 9 ml DTT-haltigem Spaltungspuffer (siehe Tabelle 2.6) induziert. Der Durchfluss wurde gestoppt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch Spülen mit 6 ml Spaltungspuffer ohne DTT (siehe Tabelle 2.6). Die Eluate wurden wie unter beschrieben 2.19.3 konzentriert und umgepuffert.

### **2.19.5 SDS-PAGE-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt werden (Laemmli, 1970). Die Proteine werden durch Aufkochen in Gegenwart von SDS denaturiert und dann in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel getrennt.

#### **2.19.5.1 Probenvorbereitung**

Um zu prüfen, ob unter den jeweiligen Bedingungen eine Expression der rekombinanten Proteine in löslicher Form stattgefunden hatte, wurden den Kulturen

zu verschiedenen Zeitpunkten 1 ml-Proben entnommen. Deren OD<sub>600</sub> wurde bestimmt und die enthaltenen Zellen durch Zentrifugation bei 13 000 rpm für 1 min sedimentiert. Pro gemessener OD<sub>600</sub> von 0,1 wurden 10 µl Roti®-Load1 zum Resuspendieren des Zellpellets eingesetzt. Anschließend wurden die Proben 5-10 min gekocht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Prestained Protein Marker“ der Fa. NEB. Üblicherweise wurden für die SDS-PAGE-Analyse 50 µg Protein eingesetzt.

#### **2.19.5.2 Herstellung der Gelmatrices und Elektrophorese**

Die Proteine wurden mit Hilfe von denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt. Es wurde eine Kammer für vertikale Plattenelektrophoresen verwendet. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel sind in Tabelle 2.7 angegeben. Das Trenngel wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und mit 70 % Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Gels wurde der 70 % Isopropanol gründlich entfernt. Das Sammelgel wurde auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisierung des Trenngels wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Lauffpuffer gespült und die Proben aufgetragen (siehe 2.19.5.1). Zunächst wurde bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisiert. Bei Eintritt der Farbmarderfront in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. 30 min nach Austritt der Lauffront aus dem Trenngel wurde die Elektrophorese beendet.

#### **2.19.5.3 Detektion der Proteinbanden**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel mit einem Skalpell entfernt und das Trenngel in die Fixierlösung überführt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das „Brillant Blue G Colloidal Concentrate“ der Fa. Sigma verwendet, dabei wurde das Protokoll des Herstellers eingehalten. Dessen Verlauf ist in Tabelle 2.18 aufgeführt.

Tabelle 2.18 Protokoll zur Detektion der Proteinbanden

Lösung	Inkubationsdauer
Fixierer	45 min
Färbelösung	1 h
Entfärber I	30 s
Entfärber II	kurz schwenken
Entfärber II	4 h

Pro Arbeitsschritt wurde 50 ml Lösung eingesetzt.

## 2.20 Analytik der von *S. aurantiaca* DW4/3-1 produzierten Sekundärmetabolite

### 2.20.1 Dioden Array gekoppelte Hochleistungsflüssigchromatographie (DAD-HPLC)

Von Trypton-Kulturen des Wildtyps und der erzeugten Mutanten wurden 100 ml Probion-Medium mit 1 % (v/v) XAD-Adsorberharz (in 250 ml Erlenmeyerkolben) mit  $5 \times 10^7$  Zellen/ml inokuliert und 4 bis 5 Tage bei 30°C und 160 rpm inkubiert. Zellmasse und Adsorberharz wurden aus 2 x 30 ml Kultur durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 10 000 rpm abgeerntet. Das Pellet wurde mit einem Spatel zerstoßen und 30 bis 45 min unter Rühren mit 30 ml Aceton extrahiert. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 600 µl Methanol aufgenommen (1:100 ankonzentriert). Zur phänotypischen Analyse mit Hilfe DAD gekoppelter HPLC wurden normalerweise 10 bis 15 µl des Extraktes injiziert.

Zum qualitativen Nachweis von Myxothiazol in den Extrakten wurde eine Hochleistungsflüssigchromatographie-Anlage vom Typ 1090 der Fa. Hewlett Packard mit Dioden-Array-Detektion verwendet. Als stationäre Phase diente eine RP-18-Trennsäule (ET125/2, Nucleosil 120-5, C18 der Fa. Macherey und Nagel). Die Zusammensetzungen der mobilen Phasen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 2.19 Trennsystem 1 für die HPLC Analyse

	Gradientenparameter	
	Zeit [min]	% Fließmittel B
<u>Fließmittel A:</u> 0,2 % Essigsäure	0	50
	5	50
<u>Fließmittel B:</u> Acetonitril	15	80
	16	80
Detektion von 200-400 nm		
Fluss: 0,5 ml/min		

Unter diesen Bedingungen besitzt Myxothiazol A eine Retentionszeit von 11 min.

Tabelle 2.20 Trennsystem 2 für die HPLC Analyse

	Gradientenparameter	
	Zeit	% Fließmittel B
<u>Fließmittel A:</u> Methanol/H <sub>2</sub> O 45:55	0	0
	7	0
<u>Fließmittel B:</u> Methanol	20	45
	26	45
Detektion von 200-400 nm	40	81,8
Fluss: 0,5 ml/min		

Unter diesen Bedingungen besitzt Myxothiazol A eine Retentionszeit von 31 min.

Tabelle 2.21 Trennsystem 3 für die HPLC Analyse

	Gradientenparameter	
	Zeit [min]	% Fließmittel B
<u>Fließmittel A:</u> 0,2 % Essigsäure	0	50
	15	70
<u>Fließmittel B:</u> Acetonitril	16	100
	17	100
	18	50
Detektion bei 252 nm	20	50
Flussrate 0,5ml/min		

Das Trennsystem 3 wurde zur Trennung von Myxothiazol A und Myxothiazol Z verwendet.



## 2.20.2 Hochleistungsflüssigchromatographie mit Masse-Detektor (HPLC-MS)

Für die HPLC Analyse mit massenselektiver Detektion wurde ein Gerät vom Typ 1100 LC system der Fa. Agilent verwendet. Als stationäre Phase diente eine RP-18-Trennsäule (ET125/2, Nucleosil 120-5, C18 der Fa. Macherey und Nagel). Die mobile Phase ist der Tabelle 2.22 zu entnehmen. Das Injektionsvolumen lag zwischen 2 und 10 µl.

Tabelle 2.22 Trennsystem für die HPLC Analyse mit massenselektiver Detektion

	Gradientenparameter	
	Zeit	% Fließmittel B
<u>Fließmittel A:</u> 5 % Acetonitril + 95 % H <sub>2</sub> O	0	10
5mM NH <sub>4</sub> Acetat + 0,003 % Essigsäure	30	100
<u>Fließmittel B:</u> 95 % Acetonitril + 5 % H <sub>2</sub> O	40	100
5 nM NH <sub>4</sub> Acetat + 0,003 % Essigsäure		

Flussrate 0,3 ml/min

Es wurde der PE Sciex API 2000 Masse-Detektor mit Elektrospray-Ionisation verwendet.

## 2.21 Fütterung von isotopenmarkierten Vorstufen

### 2.21.1 Fütterung von D8-DL-Valin

50 ml M7-Medium (in 250 ml Erlenmeyerkolben) wurden mit 2 ml einer drei Tage alten Kultur von *M. lichenicola* Me I46 inokuliert und bei 30°C und 170 rpm inkubiert. 15 mg deuteriertes D8-DL-Valin wurden in 1,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst und sterilfiltriert. Die Zugabe erfolgte in drei gleichen Portionen nach 24 h, 48 h und 72 h der Fermentation. Die Zugabe des XAD-Adsorberharzes 1 % (v/v) erfolgte ebenfalls nach 72 h. Nach 96 h Inkubation wurden die Zellmasse und der Adsorberharz durch Zentrifugation geerntet und das Pellet bis zur Extraktion eingefroren. Die Extraktion der produzierten Sekundärmetabolite erfolgte erst mit 30 ml Methanol und anschließend mit 20 ml Aceton. Die vereinten Fraktionen wurden unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und in 500 µl Methanol aufgenommen, was einer 1:100

Ankonzentrierung entspricht. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der HPLC-MS, wobei 5 µl injiziert wurden.

### 2.21.2 Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin

1000 ml M7-Medium (in 2 l Erlenmeyerkolben) wurden mit 50 ml einer drei Tage alten Kultur von *M. lichenicola* Me l46 inokuliert und bei 30°C und 170 rpm inkubiert. 10 mg [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-markiertes Methionin wurden in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  gelöst und sterilfiltriert. Die Zugabe erfolgte in drei Portionen (nach 24 h Inkubation 6 mg, nach 48 h 2 mg und nach 72 h erneut 2 mg). Die Zugabe des XAD-Adsorberharzes 1 % (v/v) erfolgte ebenfalls nach 72 h. Nach 96 h Inkubation wurden die Zellmasse und der Adsorberharz durch Zentrifugation geerntet und das Pellet bis zur Extraktion eingefroren. Melithiazol wurde isoliert (siehe (Bohlendorf *et al.*, 1999)) und einer  $^{13}\text{C}$ -NMR Analyse unterzogen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters

Zu Beginn der Arbeiten lag eine Cosmidgenbank von *S. aurantiaca* DW4/3-1 vor. Über eine PKS-Mutante war gezeigt worden, dass Cosmid E25 Bereiche des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters enthält. Vom Insert des Cosmides E25 lagen die Endsequenzen vor. Im Datenbankvergleich zeigte die vom 5'-Ende des Inserts abgeleitete Primärsequenz Ähnlichkeiten zu PKSs. Die vom 3'-Ende des Inserts erhaltene Sequenz endete innerhalb eines offenen Leserahmens, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz ähnlich zu NRPSs war. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass das Insert von Cosmid E25 nicht die vollständige Sequenz des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters enthält. Aus den Untersuchungen zur Fruchtkörperbildung von *S. aurantiaca* DW 4/3-1 war die DNA-Sequenz vor dem 5'-Ende des Inserts von Cosmid E25 bekannt (Silakowski *et al.*, 1998). Aus diesem Grund sollte in der Cosmidgenbank von *S. aurantiaca* DW4/3-1 ein Cosmid identifiziert werden, das im Bereich des 3'-Endes mit Cosmid E25 überlappt und die stromabwärtsgelegene Sequenzinformation enthält ("Anschlusscosmid"). Mit den vom 3'-Ende des Inserts von Cosmid E25 abgeleiteten Primern RME1 und RME2 wurde, wie unter 2.17 beschrieben, ein PCR-Screening durchgeführt. Dabei wurde Cosmid E3 identifiziert. Aufgrund ihrer Größe neigen die Inserts von Cosmiden zu Rearrangements. Deshalb muss ihre Kolinearität mit dem Chromosom kontrolliert werden. Dazu wurden Cosmid E3 und die chromosomale DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit verschiedenen Enzymkombinationen hydrolysiert. Zusätzlich wurde Cosmid E3 mit *NotI* und *BamHI* hydrolysiert und die erhaltenen Fragmente wie unter 2.14.1 beschrieben markiert. In der Southern Blot Analyse (siehe 2.14.2) war die Kolinearität zwischen Cosmid E3 und chromosomaler DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 lediglich im Bereich des 5'-Endes des Inserts nachzuweisen. Es lag die Vermutung nahe, dass es bei diesem Cosmid zu einem Rearrangement der Insert-DNA gekommen war. Daraufhin wurde die Cosmidgenbank von 1000 auf 2000 Klone erweitert und einer Koloniehybridisierung unterzogen (Vorgehensweise wie unter 2.16.3 beschrieben). Als Sonde diente ein 1,9 kb *HindIII/NotI* Restriktionsfragment vom 5'-Ende des

Inserts von Cosmid E3. Es konnte ein hybridisierender Klon (Cosmid E201) identifiziert werden. Die Kolinearität zwischen Cosmid E201 und chromosomaler DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde nachgewiesen. Ob und wie weit die Inserts der Cosmide E25 und E201 überlappen, sollte mit Hilfe von Southern Blot Experimenten geklärt werden. Diese lieferten jedoch keine eindeutige Aussage. Um die zwischen den Cosmiden E25 und E201 vermutete Sequenzlücke zu schließen, wurde ein 7,3 kb *HindIII/BglII*-Restiktionsfragment aus Cosmid E3 in *HindIII/BamHI* behandelten pUC18 kloniert, woraus Plasmid pESW8 resultierte (siehe Abbildung 3.1). Das Insert von pESW8 wurde unter Verwendung der Primer L1 (stammt vom 3'-Ende des Inserts von Cosmid 25) und L2 (stammt vom 5'-Ende des Inserts von Cosmid E201) sequenziert. Der Vergleich der ermittelten Sequenzen mit den Endsequenzen der Inserts der Cosmide E25 und E201 zeigte, dass beide Cosmide nur in einem 4 bp großen Bereich überlappen. Bei der Herstellung der Cosmidgenbank wurde die chromosomale DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit *Sau3AI* partiell hydrolysiert (Vorgehensweise wie unter 2.16.1 beschrieben). Die *Sau3AI*-Schnittstelle vom 3'-Ende des Inserts von Cosmid 25 ist mit derjenigen am 5'-Ende des Inserts von Cosmid E201 identisch. Um diesen Schluss nochmals zu verifizieren, wurde unter Verwendung der Primer L1 und L2 eine PCR mit genomischer DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Plasmid pESW8 als Matrizen-DNA durchgeführt. In beiden Fällen wurde ein 146 bp großes PCR-Amplifikat erhalten. Die DNA-Sequenzierung der Cosmide E25 und E201 erfolgte in der Abteilung Genomanalyse (GNA) der GBF.

### 3.2 Das Myxothiazol-Biosynthesecluster

Durch die Sequenzierung der Cosmide E25 und E201 wurden insgesamt 80 kbp Sequenzinformation erhalten. Bei der Analyse der DNA-Sequenz wurden in einem 44,8 kbp umfassenden Sequenzabschnitt neun offene Leserahmen (ORFs) mit der gleichen Leserichtung identifiziert. Zusätzlich zu ATG wurde auch GTG als mögliches Startcodon berücksichtigt. Des weiteren wurde auf mögliche Ribosomenbindestellen (RBS) geachtet.

Die ORFs 1 bis 8 wurden mit *mtaA* bis *mtaH* bezeichnet, wobei die von *mtaB* bis *mtaG* abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu bakteriellen Polyketidsynthasen vom Typ I und nichtribosomalen Peptidsynthetasen

zeigten. Die Charakteristika der Gene *mtaB* – *mtaG* und der von ihnen kodierten Proteine sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Ergebnisse der *in silico* Analyse von ORF 8 und 9 folgen unter 3.6.

Zwischen *mtaA* und *mtaB* befindet sich ein 540 bp umfassender Abschnitt, in dem ein Promotor vermutet wird. Die Gene *mtaB* bis *mtaH* sind ohne größere Abstände im Genom angeordnet. Offensichtlich wird die Expression von *mtaA*, das für eine Phosphopantetheinyltransferase (siehe nächster Abschnitt) kodiert, unabhängig von der der übrigen Genen reguliert. Mit Hilfe von  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteinen durchgeführte Promotorstudien belegen dies (Barbara Silakowski, RM, persönliche Mitteilung). Die beiden potentiellen Promotorregionen vor ORF1 und ORF2 zeigen untereinander keine Ähnlichkeiten.

Bakterien benutzen Codons, die in ihrer Basenzusammensetzung charakteristisch für die Basenzusammensetzung des Genoms sind. Der degenerierte genetische Code erlaubt die höchste Variabilität in der dritten Position. Deshalb benutzen Organismen mit einem hohen GC-Gehalt präferentiell Codons mit einem G oder einem C in dieser Position (Bibb *et al.*, 1984). Innerhalb kodierender Abschnitte besitzen Myxobakterien in der ersten Codon-Position einen GC-Gehalt von 70 %, 47 % in der zweiten und 90 % in der dritten Codon-Position, bei einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 69 % (Shimkets, 1993). Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Identifizierung von Genen und die Bestimmung des kodierenden Stranges gut möglich.

Der Sequenzabschnitt, der die Gene *mtaA* bis *mtaH* enthält, besitzt einen GC-Gehalt von 66,5 %, der typisch für Myxobakterien ist (Mandel & Leadbetter, 1965; McCurdy & Wolf, 1967). Der GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position innerhalb der identifizierten ORFs ist charakteristisch für myxobakterielle Gencluster (siehe Tabelle 3.1 und (Shimkets, 1993)) und zeigt, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um kodierende Abschnitte handelt.

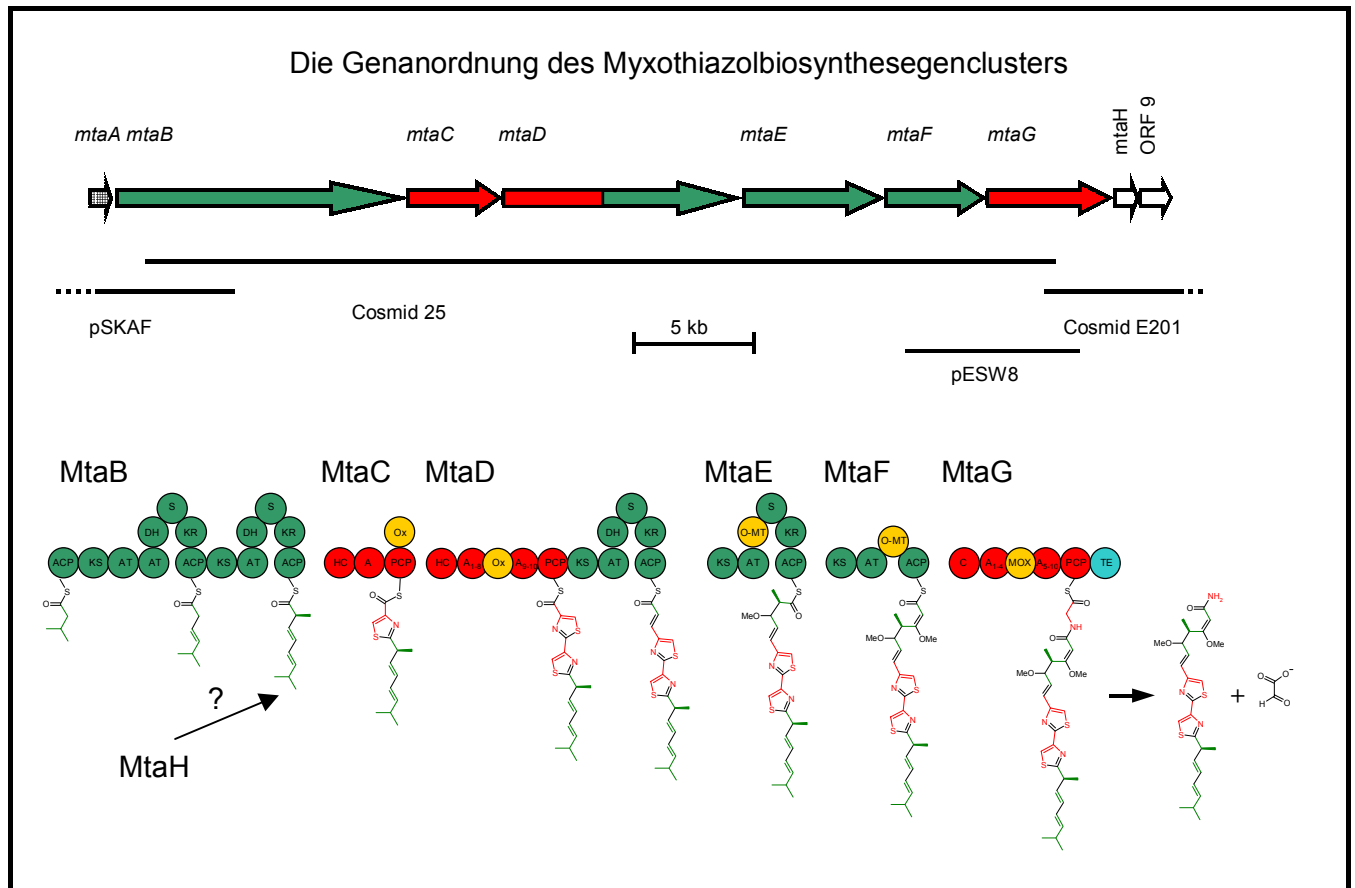


Abbildung 3.1 Die Genanordnung des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der Gene an. Der karierte Pfeil steht für *mtaA*, das für eine Phosphopantetheinyltransferase kodiert. PKS Module sind grün und NRPS Module rot dargestellt. Offene Leserahmen mit unbekannter Funktion sind weiß dargestellt. PKS Domänen werden durch grüne und NRPS Domänen durch rote Kreise symbolisiert. Die TE Domäne ist blau dargestellt. ACP: Acyl Carrier Protein, KS:  $\beta$ -Ketoacylsynthase, KR:  $\beta$ -Ketoacylreduktase, AT: Acyltransferase, DH:  $\beta$ -Hydroxy-Dehydratase, O-MT: O-Methyltransferase, S: Spacer-Region, PCP: Peptidyl Carrier Protein, C: Kondensationsdomäne, HC: Heterozyklisierungsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, Ox: Oxidationsdomäne, MOX: Monooxygenasedomäne, TE: Thioesterasedomäne

### 3.3 Analyse der *mta* Gene

Die von *mtaA* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu Phosphopantetheinyltransferasen (Lambalot *et al.*, 1996). Eine Inaktivierung von *mtaA* führte zu einer Myxothiazol-negativen Mutante (Silakowski *et al.*, 2001). Diese hatte zusätzlich die Fähigkeit zur Bildung weiterer Sekundärmetabolite verloren. MtaA wurde als unspezifische Phosphopantetheinyltransferase charakterisiert (Gaitatzis *et al.*, 2001).

540 bp stromabwärts von *mtaA* liegt das 12 024 bp umfassende *mtaB*. 3 Nukleotide stromaufwärts vor dessen ATG-Startcodon befindet sich eine mögliche RBS

(5'-AGGA-3'). Das abgeleitete Protein zeigt im computergestützten Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu PKSs. 38 Nukleotide stromabwärts von *mtaB* liegt *mtaC*, welches 3972 bp umfasst. Eine dem GTG-Startcodon vorgelagerte RBS konnte nicht gefunden werden. Die von *mtaC* abgeleitete Primärstruktur ist ähnlich zu NRPSs. Das Stopcodon von *mtaC* überlappt mit dem Startcodon des nächsten Gens, das mit *mtaD* (9876 bp) bezeichnet wurde. Deshalb wird eine translationale Kopplung beider Leserahmen vermutet. Das besondere an MtaD ist, dass es ein NRPS-Modul und ein PKS-Modul in einem Protein enthält. Das Gen *mtaE* beginnt 58 bp stromabwärts des Stopcodons von *mtaD*. Es besitzt neun Nukleotide vor seinem Startcodon wahrscheinlich eine RBS (5'-GAGAGG-3'). Im Anschluss von *mtaE* liegt *mtaF* (4083 bp). Dessen Startcodon liegt 4 Nukleotide stromabwärts des *mtaE*-Stopcodons. Eine mögliche RBS konnte nicht identifiziert werden. Innerhalb der für die AT Domänen (siehe nächsten Abschnitt) kodierenden Genabschnitte von *mtaD* und *mtaF* konnten zwei direkte Sequenzwiederholungen mit einer Identität von 99,7 % auf einer Länge von 1223 bp gefunden werden. Aufgrund der Überlappung des Stopcodons von *mtaF* mit dem Startcodon von *mtaG*, scheinen beide Gene translational gekoppelt zu sein. Die Ähnlichkeiten zu Proteinsequenzen in den Datenbanken deuten daraufhin, dass es sich bei MtaG um eine NRPS handelt.

### 3.4 Modulare Struktur der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten Proteine

Üblicherweise besteht das am N-Terminus einer Polyketidsynthase vom Typ I lokalisierte Lademodul aus einer AT und einer ACP Domäne. Es folgt das mindestens aus einer KS, einer AT und einer ACP Domäne bestehende erste Verlängerungsmodul. MtaB weist eine andere Domänenorganisation auf. Auf die N-terminal gelegene ACP Domäne folgt eine KS Domäne, dieser folgen zwei AT Domänen und die aus einer DH und einer KR Domäne aufgebaute reduktive Schleife. Das Ende des ersten Verlängerungsmoduls bildet eine ACP Domäne. Offensichtlich sind in MtaB das Lade- und das erste Extensionsmodul miteinander vermischt. Innerhalb der ersten reduktiven Schleife von MtaB wurde eine Domäne gefunden, in der das hochkonservierte Motiv funktionaler ER Domänen (Kakavas *et al.*, 1997) abgewandelt ist (siehe Abbildung 4.3). Im Hinblick auf den Reduktionsgrad der Ketidseitenkette des Myxothiazols ist an dieser Stelle keine Enoylreduktase Domäne nötig.

MtaC besteht aus einer HC, einer A und einer PCP Domäne. Folglich sind alle für die Bildung des ersten Heterozyklus nötigen Domänen vorhanden. Am C-Terminus des Proteins findet sich eine etwa 230 Aminosäuren große Domäne, die Ähnlichkeiten zu FMN-Bindeproteinen zeigt. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Entstehung eines Thiazolin-Ringes nach Cystein-Einbau aus dem Katalysemechanismus zu erklären (siehe Abbildung 1.7). Die FMN bindende Domäne könnte für die Oxidation des Thiazolin-Ringes zum Thiazol verantwortlich sein.

MtaD ist eines der seltenen Proteine, die ein NRPS Modul und ein PKS Modul enthalten. Außer den zur Minimalausstattung eines NRPS Moduls gehörenden Domänen - wobei die C Domäne durch eine HC Domäne ersetzt ist - enthält MtaD einen Proteinabschnitt mit Ähnlichkeiten zu FMN-Bindeproteinen. Dieser ist etwa 270 Aminosäuren lang und im Unterschied zu MtaC zwischen den hochkonservierten Motiven A8 und A9 (Konz & Marahiel, 1999) in die Adenylierungsdomäne inseriert. Analog zu MtaC kann hier von einer Oxidation des intermediär entstehenden (zweiten) Thiazolin-Ringes durch MtaD ausgegangen werden. Das PKS-Modul von MtaD enthält als optionale Domänen eine DH und eine KR Domäne.

Bei MtaE handelt es sich ebenfalls um eine PKS. Innerhalb der reduktiven Schleife befindet sich ein Proteinabschnitt, in dem die von Kagan und Clarke beschriebenen konservierten Motive von S-Adenosyl-Methionin (SAM)-Bindestellen identifiziert werden konnten (Kagan & Clarke, 1994). Es wurde vermutet, dass die Methoxyether-Teilstruktur über eine SAM-abhängige Methylierungsreaktion gebildet wird.

MtaF enthält neben den essentiellen Domänen eines PKS Moduls ebenfalls einen Proteinabschnitt mit Ähnlichkeiten zu bekannten SAM-abhängigen Methyltransferasen. Im Unterschied zu MtaE ist in diesem Modul jedoch keine KR Domäne vorhanden.

Die NRPS MtaG enthält im Gegensatz zu MtaC und MtaD eine Kondensationsdomäne. In der Adenylierungsdomäne von MtaG ist zwischen den hochkonservierten Motiven A4 und A5 (Konz & Marahiel, 1999) ein Proteinabschnitt inseriert, der unter anderem Ähnlichkeiten zu F<sub>420</sub>-abhängigen Monooxygenasen bzw. Hydrogenasen zeigt. Diese im folgenden als Monooxygenase (MOX) Domäne bezeichnete Domäne ist ähnlich zu der aus *Mycobacterium leprae* stammenden F<sub>420</sub>-abhängigen Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase Fgd (21,3 % Identität und 44 % Ähnlichkeit; Accession Number NP\_301315). Am C-Terminus von MtaG konnte basierend auf hochkonservierten Motiven eine Thioesterase Domäne identifiziert werden.



Tabelle 3.1 Die abgeleiteten Funktionen der für die Myxothiazolbiosynthese verantwortlichen Proteine. Die Abkürzungen sind der Legende von Abbildung 3.1 zu entnehmen.

Gen	Größe in bp; GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position; Größe des abgeleiteten Proteins	Domänen (und ihre Position in der Proteinsequenz)		Position in der Nukleotidsequenz
<i>mtaB</i>	12 024 bp (73,0/51,2/77,4) 428 091 Da	PKS	ACP (23-107) KS (112-539) AT (564-882) AT(992-1311) DH (1321-1525) ER* (1536-1823) KR (1854-2114) ACP (2127-2194) KS (2224-2651) AT (2764-3080) DH (3090-3297) S (3309-3606) KR (3637-3898) ACP (3918-3984)	1439-1693 1706-2989 3062-4018 4346-5305 5333-5947 5978-6841 6932-7714 7751-7954 8042-9325 9662-10612 10640-11263 11297-12190 12281-13064 13124-13324
<i>mtaC</i>	3 972 bp (70,9/46,6/81,3) 146 462 Da	NRPS	HC (50-449) A (536-999) PCP (1022-1090) Ox (1092-1323)	13582-14781 15040-16431 16498-16704 16708-17406
<i>mtaD</i>	9 876 bp (68,1/46,1/82,2) 357 980 Da	NRPS, PKS	HC (73-472) A (559-1299) Ox (1002-1251) PCP (1325-1389) KS (1456-1882) AT (1989-2305) DH (2316-2531) S (2622-2855) KR (2888-3149) ACP (3165-3224)	17619-18818 19077-21299 20406-21155 21375-21569 21768-23048 23367-24317 24348-24995 25266-25967 26064-26847 26895-27104
<i>mtaE</i>	5 739 bp (69,6/47,9/85,3) 211 493 Da	PKS	KS (37-465) AT (578-896) OMT (988-1262) S (1268-1497) KR (1528-1789) ACP (1823-1889)	27445-28731 29068-30024 30298-31122 31138-31827 31918-32703 32803-33003
<i>mtaF</i>	4 083 bp (66,1/42,5/88,2) 147 958 Da	PKS	KS (35-461) AT (568-884) OMT (944-1220) ACP (1272-1338)	33287-34567 34886-35836 36014-36844 36998-37198
<i>mtaG</i>	5 271 bp (70,0/45,3/84,2) 192 574 Da	NRPS	C (66-516) A (553-1377) MOX (750-1111) PCP (1398-1466) TE (1485-1756)	37459-38809 38920-41394 39511-40596 41455-41661 41716-42534

Abbildung 3.2 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten KS Domänen. Es sind die Proteinabschnitte abgebildet, welche die hochkonservierten Motive enthalten. Aminosäuren, die mit dem Konsensusmotiv funktionaler KS Domänen übereinstimmen, sind grau unterlegt (Donadio *et al.*, 1991). Schwarz unterlegt sind die polaren Aminosäuren, die in der  $\beta$ -Keto Acyl Synthase II (KAS II; FAS: Fatty acid synthase) aus *E. coli* hochkonserviert sind (Huang *et al.*, 1998). "x" steht für eine beliebige Aminosäure. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.5.2 Analyse der Acyltransferase Domänen

Die AT Domänen von Lademodulen wählen den Coenzym A-Thioester der Carbonsäure aus, mit der die Biosynthese startet. Den AT Domänen interner Module dienen die Coenzym A-Thioester von Dicarbonsäuren (in der Regel Malonyl- oder Methylmalonyl-CoA) als Substrate. Das für funktionale AT Domänen beschriebene hochkonservierte Motiv GxSxG (Haydock *et al.*, 1995) wurde in den sechs AT Domänen der MTAS identifiziert. In vorangegangenen Arbeiten wurden Konsensusmotive definiert, die eine Unterteilung in Malonyl-CoA- und Methylmalonyl-CoA-spezifische AT Domänen ermöglichen (Ikeda *et al.*, 1999). Mit diesen kann die Substratspezifität myxobakterieller AT Domänen allerdings nicht zweifelsfrei vorhergesagt werden (Silakowski *et al.*, 2001). Von Hans Jürgen Hecht und Steven Kendrew durchgeführte Modelling-Studien zeigten, dass myxobakterielle AT Domänen, die 103 Aminosäuren hinter dem GxSxG Motiv die Aminosäuren HAFH enthalten, spezifisch für Malonyl-CoA sind (RM, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu enthalten Methylmalonyl-CoA-spezifische AT Domänen an dieser Stelle die Aminosäureabfolge YASH. Diese Motive zur Bestimmung der Substratspezifität wurden durch bioinformatische Studien bestätigt (Yadav *et al.*, 2003). In den AT Domänen der MTAS finden sich zwei Ausnahmen von den Spezifitätsmotiven. In der Malonyl-CoA-spezifischen AT2 Domäne von MtaB ist das erste Histidin des HAFH-Motives durch Tyrosin substituiert (siehe Abbildung 3.3). Die AT Domäne von MtaE, die im Hinblick auf die chemische Struktur Methylmalonyl-CoA-spezifisch sein muss, enthält statt YASH die Aminosäureabfolge VASH (siehe Abbildung 3.3).

Konsensus		GxSxG	
	Pos	624	
MtaB	AT1	LPLVLAFQISLAALWRSWGIEPSATVGYSSVGEWAAAQVAGILTIEEVFALAYHYI-	65 AS-
MtaB	AT2	QPLLFAFQVALAALWESWGIRPDVVGHSVGEISAAHVAGVLSLEEALSLVVSRS-	65 AS-
MtaD	AT	QPALFAVEYALAQWLKSWGKPAAVMGHSLGEYVAACVAGMCTQEEGLKVVAARG-	65 AS-
MtaF	AT	QPALFAVEYALAQWLKSWGKPAAVMGHSLGEYVAACVAGMCTQEEGLKVVAARG-	65 AS-
MtaB	AT3	QPAHFALQSALLALLRSWGIEPDVAGSSIGEVAAYAAAGVLTLEEAMRITVARS-	65 AS-
MtaE	AT	QPVLFAVSVSLAAKWRSWGIEPDVVGHSVMGEVAAAYVAGVLSLEDAAKVICLRS-	65 AS-
	Pos	744	
MtaB	AT1	FARLVEIDFYAHIPQVEALKPLFLQSCPVLRLPSPGRVPMVSTVSGAFVDGGTLG	
M-CoA		HAFH	
MtaB	AT2	RVRVLNVNYYAFHSAQMAPYLGDLDPVLRELKPKPPRLPIYSTVHGRLASASDFG	
MtaD	AT	DCRKLKTTT <del>HAFH</del> SPLMEPMLEEFKEAGKVWKRPEIEVVSNVSGQLAKGEEGQ	
MtaF	AT	DCRKLKTTT <del>HAFH</del> SPLMEPMLEEFKEAGKVWKRPEIEVVSNVSGQLAKGEEGQ	
MM-CoA		YASH	
MtaB	AT3	SCRRIGLDYASHSPAPEPYIDELKQALQGLRPQAAIPIFSTVTGRLAEAGDFN	
MtaE	AT	FCRNVKVDYASHSPQVEPLLAELRDVLKDLRPKAASVPVFSTVTGKATDGTDWD	

Abbildung 3.3 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten AT Domänen. Aminosäuren, die mit dem hochkonservierten Motiv funktionaler AT Domänen (Haydock *et al.*, 1995) übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die Sequenzabschnitte, die eine Unterscheidung in Malonyl-CoA (M-CoA) und Methylmalonyl-CoA (MM-CoA) spezifische AT Domänen ermöglichen, sind schwarz unterlegt. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.5.3 Analyse der $\beta$ -Ketoacylreduktase Domänen

Nach einem Verlängerungsschritt kann der  $\beta$ -Ketoacylthioester von einer NADPH-abhängigen Reduktase zum sekundären Alkohol reduziert werden. In vier der fünf PKS-Extensionsmodule kommt eine solche optionale Domäne vor. Diese enthalten das für NADPH-Bindestellen definierte GxGxxGxxxA Motiv (Tang *et al.*, 1998). In der MtaE KR ist das hochkonservierte Alanin durch ein Serin ersetzt, was die Funktionalität dieser Domäne jedoch nicht beeinflusst. In den bekannten PKSs findet man ein weiteres hochkonserviertes Motiv Lx(S,G)Rx(G,T,A) (Scrutton *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1998). Es wurde berichtet, dass das hochkonservierte Arginin mit der 2'-Phosphatgruppe von NADPH interagiert. Dieses Konsensusmotiv konnte ebenfalls in den vier analysierten KR Domänen identifiziert werden. Die Identitäten zwischen der MtaE KR und den übrigen KR Domänen liegen zwischen 32,6 % und 35,2 %. Die Identitäten dieser drei KR Domänen untereinander liegen zwischen 43 % und 47,5 %. Diese Befunde werden in 4.11.4 diskutiert.

Abbildung 3.4 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten KR Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche die beiden Konsensusmotive enthalten (Scrutton *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1998). Die Aminosäuren, die mit den hochkonservierten Motiven funktionaler KR Domänen übereinstimmen, sind grau unterlegt. Sind innerhalb der hochkonservierten Motive verschiedene Aminosäuren möglich, wurden diese untereinander stehend aufgelistet. Angegeben ist die Position des ersten Proteins.

DH Domänen wurden in den beiden Verlängerungsmodulen von MtaB und in dem PKS Modul von MtaD gefunden. In vorangegangenen Arbeiten ist für diesen Domärentyp das folgende Konsensusmotiv definiert worden LxxHxxxGxxxxP (Bevitt *et al.*, 1992; Donadio & Katz, 1992). In den beiden aus MtaB stammenden DH Domänen ist das hochkonservierte Prolin durch ein Alanin ersetzt. Diese sind jedoch im Hinblick auf die Struktur von Myxothiazol aktiv. Die konservative Substitution eines Leucins durch Isoleucin in der DH Domäne von MtaD hat ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität.

Abbildung 3.5 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten DH Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche das hochkonservierte Motiv funktionaler DH Domänen enthalten (Bevitt *et al.*, 1992; Donadio & Katz, 1992). Aminosäuren, die mit diesem übereinstimmen, sind grau unterlegt. Angegeben ist die Position des ersten Proteins.

Über Datenbankvergleiche auf Aminosäureebene lassen sich innerhalb der PKS-Module von MtaE und MtaF Domänen mit Homologien zu SAM-abhängigen

Methyltransferasen identifizieren. Diese beiden Domänen sind auf Aminosäureebene zu 34,9 % identisch zueinander. Aufgrund der Methoxygruppe und der  $\beta$ -Methoxyacrylat-Teilstruktur des Myxothiazols kann davon ausgegangen werden, dass es sich um neuartige O-Methyltransferase (O-MT) Domänen handelt. In PKS-Module integrierte O-MT Domänen waren bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. SAM-abhängige Methyltransferasen zeigen aufgrund der großen strukturellen Vielfalt der Substrate (Proteine, DNA, Sekundärmetabolite etc.) und der verschiedenen Zielatome (O, N, C, S) nur schwache Homologien zueinander. Lediglich vier Motive sind in der Cofaktorbindefalte konserviert (Kagan & Clarke, 1994; Martin & McMillan, 2002). Die vermuteten O-MT Domänen aus MtaE und MtaF stimmen gut mit den vier Konsensusmotiven überein.

	Motiv I	Motiv Post I
	L	
	IVEV C P	E
Konsensus	VLDIGGGTG	hhXhD
Pos 1029		
MtaE OMT	FRGVDWSSVRKVLD <b>DFGCGY</b> ASDLISLGKKH <del>PHL</del> TLHG <del>YT</del> ISAE <b>QAA</b> IDEERV <del>R</del> ARGLQDR	
MtaF OMT	FRGLNFP <del>AFSRV</del> <b>VLDIGCGH</b> SADLIDLAMK <del>HS</del> HL <del>EL</del> HGCNISP <b>DQ</b> IAVGRQ <del>R</del> IRGLGLDER	
	Motiv II	Motiv III
	A Y L	L I
	GTY VIV	K IIFL
Konsensus	PQFDAIFC	LLRPGGRLLI
Pos 1089		
MtaE OMT	IRVFARDSAKDAFPDRYDL <b>IFGFE</b> VVTHIADKVALFSNISRNL <b>QNGGF</b> LLLADFIANSVS	
MtaF OMT	ITLHYQDSSRD <del>FP</del> STYDLV <b>LG</b> FQVIHHRNKADLFANISRS <b>MRNGGY</b> LVMAETLSNMVT	

Abbildung 3.6 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten O-MT Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche die konservierten Motive SAM-abhängiger Methyltransferasen enthalten (Kagan & Clarke, 1994). Aminosäuren, die mit diesen übereinstimmen, sind grau unterlegt. Sind innerhalb der beschriebenen Motive verschiedene Aminosäuren möglich, wurden diese untereinander stehend aufgelistet. "h" steht für eine hydrophobe Aminosäure. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.5.6 Analyse der Acyl Carrier Protein und Peptidyl Carrier Protein Domänen

Die etwa 75 Aminosäuren langen Carrier Protein Domänen werden durch das Verknüpfen mit dem aus Coenzym A stammenden Phosphopantetheinrest posttranslational aktiviert (Lambalot *et al.*, 1996). Der Phosphopantetheinrest wird dabei auf die Hydroxylgruppe eines hochkonserviertes Serins übertragen. Der Vergleich der aus der MTAS stammenden Carrier Protein Domänen mit den

beschriebenen Konsensusmotiven zeigt eine gute Übereinstimmung (Konz & Marahiel, 1999; Tang *et al.*, 1998).

ACPs			PCPs		
Konsensus		LGFD	Konsensus		DxFFxxLGGHSL
Pos 40			Pos 1041		
MtaB ACP1	VRIT	EPFFSLGVGSVFATRLIAELA	MtaC PCP	EPEAGLLQLGATSVELIKLSMMLEQ	
MtaB ACP2	IDPRRPLQELGLDSL	LMALQFRNSLA	MtaD PCP	DVHRNFFDLGGTSVHIVQMHRMKE	
MtaB ACP3	ADGRLPLVRF	GFDSLMSLKLKARLE	MtaG PCP	GVASSFFQLGGHSL	LAVRLMSRLRA
MtaD ACP	LAGNQRLFEIGMDSL	LAVELRNRFQ			
MtaE ACP	LEPQQGFFQMGMNSL	MSIELKKHLE			
MtaF ACP	LDPEQPLNSMGMDSL	LSLELKKHIH			

Abbildung 3.7 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten ACP und PCP Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche die in der Literatur beschriebenen Konsensusmotive dieser Domärentypen enthalten (Konz & Marahiel, 1999; Tang *et al.*, 1998). Aminosäuren, die mit dem jeweiligen Konsensusmotiv übereinstimmen, sind grau unterlegt. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.5.7 Analyse der Kondensationsdomäne

C Domänen katalysieren die Bildung von Peptidbindungen, wobei sie das wachsende Intermediat mit der nächsten Aminosäure verknüpfen. Die einzige C Domäne der MTAS befindet sich am N-Terminus von MtaG. Über Datenbankvergleiche auf Aminosäureebene wurden in MtaG die für diesen Domärentyp definierten Konsensusmotive identifiziert (Konz & Marahiel, 1999).

Motiv	C1	C2	C3	C4
Konsensus	MY		V	F
Pos	SxAQxRLWxL	RHExLRTxF	MHHxISDGWS	YxDYAVW
Pos	66	112	190	230
MtaG C	SHGQQALWFFV	RHGALRTTV	IHHIVYDGWS	YVDYVRW

Motiv	C5	C6	C7
Konsensus	I	N V	
Pos	VGxFVNLT	HQDYPFE	RDxSRNPL
Pos	345	381	397
MtaG C	VGNEFMNI	HQDYPFH	RHSNSSPI

Abbildung 3.8 Sequenzanalyse der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten C Domäne. MtaG ist nur in den Bereichen der hochkonservierten Konsensusmotive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999). Aminosäuren, die mit diesen übereinstimmen, sind grau unterlegt. Angegeben ist die jeweilige Position von MtaG.

### 3.5.8 Analyse der Adenylierungsdomänen

A Domänen wählen gemäß ihrer Substratspezifität eine Aminosäure aus, die sie unter ATP-Hydrolyse zum Aminoacyladenylat aktivieren. Die von Marahiel und Mitarbeitern definierten Konsensusmotive A1 bis A10 (Konz & Marahiel, 1999) lassen sich gut in den A Domänen der MTAS identifizieren (siehe Abbildung 3.9). Lediglich innerhalb des Motives A2 sind die Aminosäuren um eine Position versetzt.

Motiv	A1	A2	A3	A4
	S	L I	T	
Konsensus	LTYxEL	LKAGxAYLVPLD	LAYxxYTSGSTGxPKG	FDxS
Pos	536	576	647	697
MtaC A	MSYGELL	AIHLAGSAYLPIDP	DMAYCIYTSGSTGRPKG	GFDLSV
MtaD A	LSYGKLE	AILRAGAAYLPLSP	NLAYVIYTSGSTGRPKG	SFDLSV
MtaG A	LTYRELD	GILKAGGAYVPMDF	NVAYTLYTSGSTGRPKG	SFDISI

Motiv	A5	A6	A7
		L	K
Konsensus	NxYGPTE	GELxIxGxGVARGYL	YRTGDL
Pos	794	847	882
MtaC A	ISLGGATEA	PGDLYIGGVGLAQGYFR	LYRTGDLG
MtaD A	VSLGGATEA	AGQMYIGGIGLSLGYR	LYATGDLG
MtaG A	LNMYGPTET	PGELLIGGEGVARGYLD	LYRTGDLA

Motiv	A8	A9	A10
		V	L
Konsensus	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	LPxYMIP	NGKVDR
Pos	900	970	990
MtaC A	LGRKDFQVKIAGHRIELGEIEA	ALPQYMVPA	SNGKVDR
MtaD A	LGREDFQVKIQGYRIELGEIEA	KLPEYMVPS	SNGKVDR
MtaG A	LGRMDQQVKVRGVRIEFGIEIS	KLPVSMIPD	PNKKLDV

Abbildung 3.9 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten A Domänen. Die A Domänen sind nur in den Bereichen der hochkonservierten Konsensusmotive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999). Grau unterlegt sind die Aminosäuren, welche mit den Konsensusmotiven übereinstimmen. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

Die Kristallstrukturanalyse der Phenylalanin-spezifischen A Domäne der Gramacidinsynthetase hatte gezeigt, dass die Substratspezifität dieses Domärentyps von acht nicht konservierten Aminosäuren bestimmt wird (Conti *et al.*, 1997). Diese befinden sich zwischen den hochkonservierten Motiven A4 und A6. Mit Hilfe bioinformatischer Studien konnte der Spezifitätscode der A Domänen entschlüsselt werden (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). Um die spezifitätsbestimmenden Reste ermitteln zu können, wurden die A Domänen der MTAS zunächst mit der Phenylalanin-spezifischen A Domäne der



Gramicidinsynthetase verglichen, welche als Bezugsbasis dient. Die so identifizierten Aminosäuren wurden mit dem Spezifitätscode verglichen (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Die spezifitätsbestimmenden Aminosäuren der A Domänen der MTAS. Die Nummerierung bezieht sich auf die Phenylalanin-spezifische A Domäne der Gramicidinsynthetase (Conti *et al.*, 1997).

Position		235	236	239	278	299	301	322	330
Consensus Cystein		D	LH	YFE	NS	LMD	SIV	MLG	I
MtaC		D	L	Y	N	M	S	L	I
MtaD		D	L	Y	N	L	S	L	I
Konsensus Glycin		D	LI	FLQ	NQM	NLF	AGV	LA	TIM
MtaG		D	I	L	Q	L	G	M	I

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fütterungsexperimente (Trowitzsch-Kienast *et al.*, 1986) wurde für die A Domänen von MtaC und MtaD Cystein als wahrscheinlichstes Substrat identifiziert. Aufgrund der Insertion der MOX Domäne zwischen den hochkonservierten Motiven A4 und A5 von MtaG ist der Spezifitätscode auf dieses Protein nur schwer anwendbar. Dennoch weisen die spezifitätsbestimmenden Reste auf Glycin als Substrat hin.

### 3.5.9 Analyse der Heterozyklisierungsdomänen

In internen NRPS-Modulen können C Domänen durch HC Domänen ersetzt sein. Diese sind für die Bildung von fünfgliedrigen Heterozyklen verantwortlich (siehe Abbildung 1.7). Von den Proteinen der MTAS enthalten MtaC und MtaD diesen Domänentyp. Deren Sequenzanalyse führte zur Identifizierung der von Konz und Marahiel beschriebenen Konsensusmotive (Konz & Marahiel, 1999). Bei einer insgesamt guten Übereinstimmung mit den Konsensusmotiven fallen lediglich innerhalb von Motiv Z2 Abweichungen auf.

Motiv	Z1	Z2	C3	Z3
	S	L	R	L F
		M A D	N	I A P
Konsensus	FPLTxxQxAYxxGR	RHxILPxNGxQ	DxxxxDxxS	LPxxPxLP
Pos	53	108	184	248
MtaC HC	PFPLTDIQET <sup>53</sup> YFVGRG	LRSVVLPTGEQ <sup>108</sup> RV	FDAITADASAV	DMPDAPALPV
MtaD HC	PFPLTDIQNAYWVGRQ	LRMVVLPTGEQ <sup>108</sup> VV	FDLLTADAFSV	KLPNAPDLPL

Motiv	Z4	Z5	Z6	Z7
	F T	N		F
	SA A V	AQ	V A	I H Y
Konsensus	TPxxxLxxxxxxILxxW	GDFT	PIVFTSxL	QVxLDxQxxxxxxxxxxWD
Pos	293	336	394	429
MtaC HC	LTASGVVCAAF <sup>293</sup> EVLGAWS	LGDFTT	MPVVFTSL <sup>394</sup> LG	PQMWLDHQVREEAGALYCHWDD
MtaD HC	ITASMALCAAYGETL <sup>293</sup> RAYS	VGDFTS	MPYVFTSL <sup>394</sup> LIS	PQVWLDHQVFELDGGIYSWDD

Abbildung 3.10 Sequenzvergleich der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten HC Domänen. Die HC Domänen sind nur in den Bereichen der hochkonservierten Konsensusmotive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999). Grau unterlegt sind die Aminosäuren, welche mit den Konsensusmotiven übereinstimmen. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.5.10 Analyse der potentiellen Oxidationsdomänen

Proteindomänen mit Ähnlichkeiten zu FMN-Bindeproteinen findet man nur in NRPS Modulen, die Thiazolringe bilden, nicht aber in NRPS Modulen, die für die Bildung von Thiazolin- oder Thiazolidinringen verantwortlich sind (siehe Bacitracin (Konz *et al.*, 1997) und Yersiniabactin (Gehring *et al.*, 1998)). Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass dort eine solche Oxidation nicht stattfindet.

Die beiden potentiellen Ox Domänen von MtaC und MtaD sind zu 39,4 % identisch zueinander. Dennoch sind sie an unterschiedlichen Stellen im Protein lokalisiert. In MtaC liegt die Ox Domäne hinter der PCP Domäne. Im Gegensatz dazu ist die Ox Domäne von MtaD in die A Domäne inseriert. Die beiden Ox Domänen wurden mit einer weiteren myxobakteriellen Domäne dieser Art aus der Epothilonsynthetase verglichen (Julien *et al.*, 2000; Molnar *et al.*, 2000). Die von Shen und Mitarbeitern identifizierten Konsensusmotive für Ox Domänen (Du *et al.*, 2000) wurden mit guter Übereinstimmung identifiziert.

Motiv	Ox-1
Konsensus	YxSAGxxYxVQxYx
Pos 1148	
MtaC Ox	EARVLARLLSCLSP LKVEGQL--KYQYGSAGGIYGVQTYLSIATGRVRLDAGAYYYDPL
MtaD Ox	SLERLSELLSCLMQIALED SMMPKYRYASAGGLYPVQVYLHVLPGRVGGLAGGTYYYHPK
EpoP Ox	PFVEFGRLSCLSSVEPDGATLPKFRYP SAGSTYFVQTYAYVKSGRIEGVDEGFYYYHPF
Motiv	Ox-2
Konsensus	EAG
Pos 1206	
MtaC Ox	RHTLVQLGGASALPAALDSSA-NAAMADSAAFSLYLVDGRRVISQRYGERWRDLALIEAG
MtaD Ox	RHELVLTLTADAAMDRSQHASR-NRPVFDAAAFSVFLVGLKLSAIAPLYGSMARDFCMIEAG
EpoP Ox	EHRLCLKLSDH-GIERGAHV-RQNFDFDEAAFNLLFVGRIDATESLYGSSSREFCLEAG
Konsensus	xMxQLLxxxAxxxxxGxC
Pos 1256	
MtaC Ox	LMAQLLETRAESDLGLCQLEELRFEGLSKALRLEREEHMYLHGLVGGGLAWEEGAL.
MtaD Ox	YMAQLLMSVAPAHKMGLCPIGVMDFEPLRSQALALDEHHVLLHSFLGGGAVTAAAAAK
EpoP Ox	YMAQLLMEQAPSCNIGVCPVGQFNFEQVRPVLDLRHSDVYVHGMLGGRVDPRQFV--

Abbildung 3.11 Sequenzvergleich der in myxobakteriellen NRPSs gefundenen Ox Domänen. Es sind nur die Proteinabschnitte mit signifikanten Ähnlichkeiten abgebildet. Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit den Konsensusmotiven überein (Du *et al.*, 2000). Gelb unterlegte Aminosäuren sind in allen drei Proteinen identisch. Rot unterlegt sind Aminosäuren, die in zwei Proteinen vorhanden sind. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.5.11 Analyse der Monooxygenase Domäne

Wie in 3.4 beschrieben, ist in die A Domäne von MtaG eine Domäne mit Ähnlichkeiten zu F<sub>420</sub>-abhängigen Monooxygenase und bakteriellen Luciferasen inseriert. Purwantini und Daniels haben vier Konsensusmotive für F<sub>420</sub>-abhängige Oxidoreduktasen definiert (Purwantini & Daniels, 1998). Die Autoren spekulieren, dass nicht alle Konsensusmotive zwingend vorhanden sein müssen. Die Konsensusmotive 1 und 2 wurden mit guter Übereinstimmung in der potentiellen MOX Domäne von MtaG identifiziert. Im Gegensatz dazu konnten die Motive 3 und 4 nicht identifiziert werden. Abbildung 3.12 zeigt den Sequenzvergleich der MOX Domäne von MtaG mit F<sub>420</sub>-abhängigen Oxidoreduktasen und einer FMN-abhängigen Luciferase (LXA).

```

Konsensus1      AExxGxDxxxxxxDH                      TxxIxLGxxVxxPx
Pos            780
LXA             LVKLGRISEECGFDTVWLLLEHHFTEF-GLLGNP--YVAA--AYLLGATKKLNVGTAAIVLP
FGD             LVELGVAAEAHGMDSA-TVSDHFQPWRH-QGGHASFSLSWMTAVGERTNRIILLGTSVLTPT
Mith            LWREVEDADRLGFDYAFSVEHHCTPHESWMPSPAVFCTG--AAL--RTERIRVGPMGWVPP
MtaG MOX        LLEGARFADQHGFTAVWTPERHFHFPFGGIFPNPSV--VS--AALAATTRNIRIRAGSVVLP

Konsensus2      xRxxPAxxAxAxATxxxLxxGRxxLGxGxG
Pos            837
LXA             TA-HPVRQLEDVNLLDQMSKGRFRFGICRG
FGD             FRYNPAVIGQAFATMGCLYPNRVFLGVGTG
Mith            LR-HPLHLVEEVATLDQLLGGRLLEVGLASG
MtaG MOX        LH-SPIRVAEEWSIVDNLSNGRVDLSFASG

```

Abbildung 3.12 Analyse der MOX Domäne von MtaG. Es sind nur die Proteinabschnitte mit signifikanten Ähnlichkeiten abgebildet. Die Aminosäuren, die mit den Konsensusmotiven übereinstimmen, sind grau unterlegt (Purwantini & Daniels, 1998). Die Nummerierung bezieht sich auf MtaG. Die verglichenen Aminosäuresequenzen stammen aus den folgenden Organismen: *Photorhabdus luminescens* (LXA), *Mycobacterium leprae* (F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase (FGD)) und *Streptomyces lavendulae* (Mith).

### 3.5.12 Analyse der Thioesterase Domäne

Nach dem letzten von PKSs oder NRPSs katalysierten Verlängerungsschritt wird das Intermediat von der am C-Terminus befindlichen TE Domäne durch Hydrolyse oder unter Zyklisierung abgespalten. Durch computergestützten Datenbankvergleich konnte in der C-terminalen Domäne von MtaG das für diesen Domärentyp definierte Konsensusmotiv identifiziert werden (Konz & Marahiel, 1999).

```

          Y
Konsensus      GHSxG
Pos 1545
MtaG TE        RPKGPYRLGGWSTGGILAQAMAR

```

Abbildung 3.13 Analyse der TE Domäne. Es ist nur der Abschnitt von MtaG abgebildet, der das hochkonservierte Motiv funktionaler TE Domänen enthält (Konz & Marahiel, 1999). Aminosäuren, die mit dem Konsensusmotiv übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die Nummerierung bezieht sich auf MtaG.

## 3.6 Analyse der stromabwärts des *mta* Clusters gelegenen offenen Leserahmen

15 Nukleotide stromabwärts des Stopcodons von *mtaG* befindet sich das Startcodon von *mtaH*. Diesem ist im Abstand von 5 Nukleotiden eine potentielle RBS (5'-GAGG-3') vorgelagert. Das von dem 975 bp langen Gen abgeleitete Protein ähnelt

Heptadienisomerasen. MtaH ist dem in *Methanothermobacter thermautotrophicus* identifizierten Protein MTH1507 zu 42 % identisch und zu 55 % ähnlich (Accession Number NP\_276621). Zu SAV564 aus *Streptomyces avermitilis* MA-4680 beträgt die Identität 42 % und die Ähnlichkeit 57 % (Accession Number NP\_821739).

ORF 9 beginnt 45 bp stromabwärts vom *mtaH*-Stopcodon. Dieser besitzt direkt vor seinem ATG-Startcodon die Sequenz 5'-GGGGAGGG-3' innerhalb der eine RBS vermutet wird. Die von ORF 9 abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt im computergestützten Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu Poly-A-Polymerasen. Zu der aus *Lactobacillus plantarum* WCFS1 stammenden PapL beträgt die Identität 48 % und die Ähnlichkeit 65 % (Accession Number NP\_785420). Zu der in *Clostridium perfringens* identifizierten Poly-A-Polymerase PapS beträgt die Identität 48 % und die Ähnlichkeit 67 % (Accession Number NP\_560938).

Tabelle 3.3 Die stromabwärts des *mta* Clusters lokalisierten Leserahmen

	Größe in bp; GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position	Größe des abgeleiteten Proteins	Position in der Nukleotidsequenz
<i>mtaH</i>	975 bp (62,0/43,2/88,6)	35 678 Da	42550-43524
ORF 9	1272 bp (75,6/45,1/85,3)	46 243 Da	43570-44841

### 3.7 Mutageneseverfahren zur Erzeugung von markerlosen Mutationen unter Erhalt des Leserahmens

Um die für die neuartigen Domänen postulierten Funktionen in der Biosynthese untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeiten eine Methodik zur Erzeugung von markerlosen Punktmutationen und Deletionen unter Erhalt des Leserahmens etabliert. Bei markerlos in das Chromosom eingeführten Veränderungen ist ein polarer Effekt auf die nachfolgenden Gene praktisch ausgeschlossen. Eine entsprechende Methodik existierte bisher nur für die Gattung *Myxococcus* (Wu & Kaiser, 1996). Das für *S. aurantiaca* DW4/3-1 adaptierte Protokoll wurde auf alle ungewöhnlichen Domänen angewendet, um über den Nachweis der produzierten Myxothiazolderivate in den Mutanten das jeweilige

Postulat zu bestätigen. Waren in der Literatur hochkonservierte Motive beschrieben, wie im Falle der SAM-abhängigen Methyltransferasen, wurden Punktmutationen eingeführt (siehe 3.12). Deletionen wurden dann erzeugt, wenn noch keine Konsensusmotive beschrieben worden waren, wie z.B. im Fall der möglichen Ox Domänen (siehe 3.10).

### **3.7.1 Allgemeiner Ablauf der Mutagenesen zur Erzeugung von markerlosen Mutationen und Deletionen unter Erhalt des Leserahmens**

Das System zur gerichteten Mutagenese basiert auf einer zweifachen homologen Rekombination in *S. aurantiaca* DW4/3-1. Zur Konstruktion der entsprechenden Mutageneseplasmide (siehe Abbildung 3.14) wurde der Vektor pSWU41 verwendet, welcher sowohl ein Kanamycin-Resistenzgen als auch das *sacB*-Gen enthält (Jager *et al.*, 1992); (Wu & Kaiser, 1996). Auf der Kanamycin-Resistenz beruht die Selektion nach der ersten homologen Rekombination. Das *sacB*-Gen kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in einen zelltoxischen Metaboliten umwandelt. Dies wird zur Gegenselektion nach dem zweiten Cross-over ausgenutzt. Nach der Elektroporation des Mutageneseplasmides in *S. aurantiaca* DW4/3-1 kommt es über homologe Rekombination (siehe Abbildung 3.14) zur spezifischen Inaktivierung des Zielgens. Die merodiploiden Mutanten werden auf Kanamycin selektioniert. Der Wegfall des Selektionsdruckes ermöglicht eine zweite homologe Rekombination, bei der in Abhängigkeit vom Ereignisort entweder wieder der Wildtyp oder die gewünschte Mutante entsteht. Die Selektion erfolgt hier gegen Saccharose. Genotypisch wurden die Mutanten mittels Southern Blot Analyse und PCR charakterisiert. Die phänotypische Analyse erfolgte mit DAD gekoppelter HPLC. Mutanten, die nach der zweiten homologen Rekombination die gewünschte Veränderung im Chromosom zeigten, wurden zusätzlich einer HPLC Analyse mit massenselektiver Detektion (HPLC-MS) unterzogen. Zur abschließenden Kontrolle wurde der veränderte Genabschnitt aus dem Mutantenchromosom mit Hilfe einer proofreading-Polymerase amplifiziert und in pCR<sup>®</sup>-2.1 TOPO kloniert. Die geplanten Mutationen wurden durch die DNA-Sequenzierung der Inserts der erhaltenen Konstrukte verifiziert.

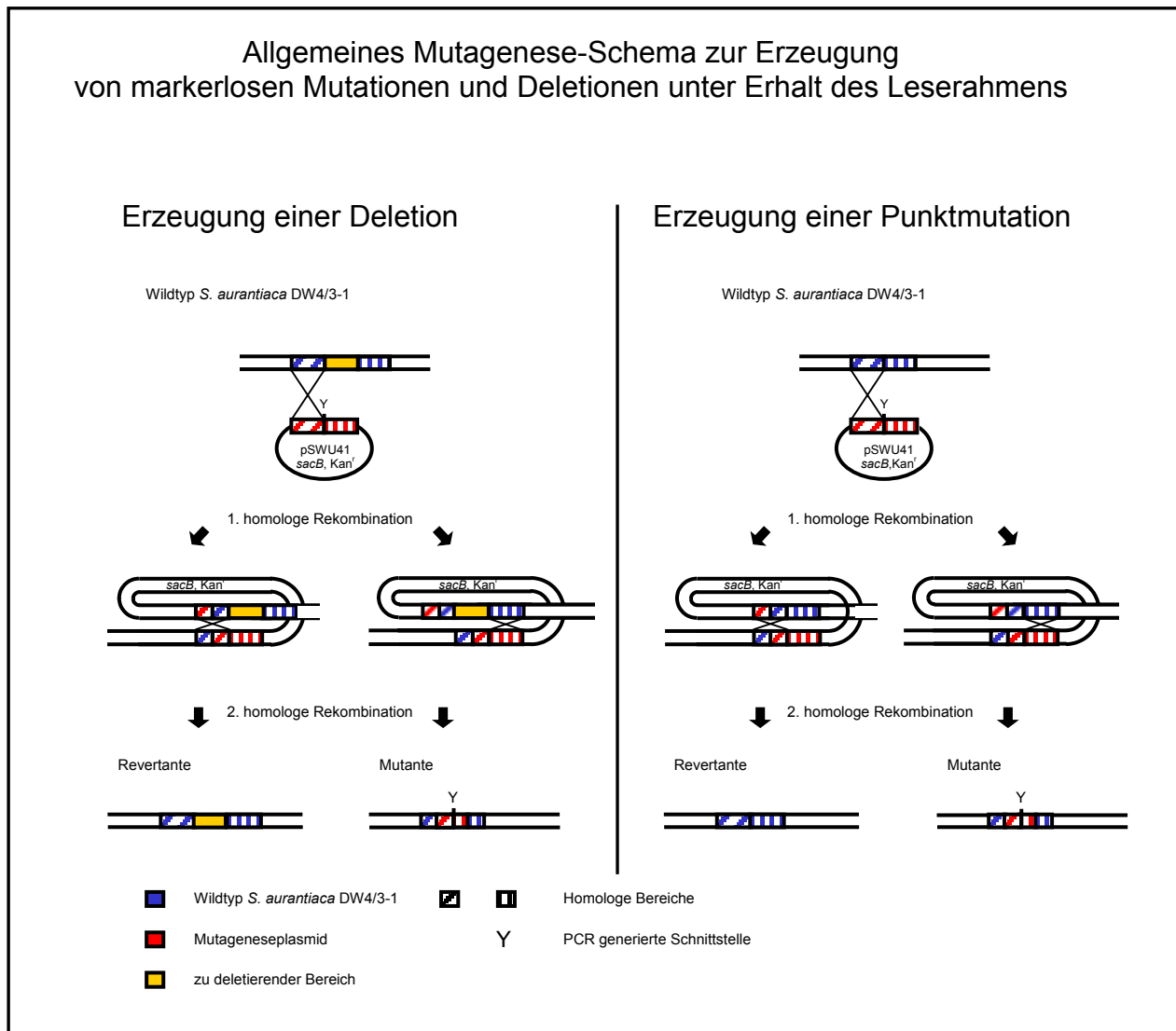


Abbildung 3.14 Allgemeines Mutagenese-Schema zur Erzeugung von markerlosen Mutationen und Deletionen unter Erhalt des Leserahmens. Ereignen sich erste und zweite homologe Rekombination auf einer Seite der PCR-generierten Schnittstelle Y, so verbleibt das unveränderte Gen im Chromosom. Kommt es auf unterschiedlichen Seiten der PCR-generierten Schnittstelle zur Rekombination, verbleibt die gewünschte Mutation im Chromosom.

### 3.7.2 Konstruktionsbeschreibung diverser Mutageneseplasmide

Die Mutationen wurden über das Primerdesign mit Hilfe der PCR erzeugt. Es wurden zwei Primerpaare generiert (A und B, C und D; siehe Abbildung 3.15), von denen die Primer B und C in dem Bereich, der durch Punktmutation verändert werden soll, eine Schnittstelle Y enthalten. Im Fall einer Deletion begrenzen die beiden PCR-

Amplifikate I und II, die im Mutageneseplasmid ebenfalls über eine erzeugte Schnittstelle Y verknüpft werden, den zu deletierenden Bereich. Ausgehend von den beiden PCR-Produkten I und II erfolgte die Konstruktion der Mutageneseplasmide nach den alternativen Klonierungsstrategien A und B. Beim Umsetzen der Klonierungsstrategie A wurden die beiden PCR-Produkte I und II zunächst in pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert und durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Für die Klonierung in pSWU41 wurden die PCR-generierte Schnittstelle Y und die Schnittstellen X und Z aus dem Polylinker von pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO genutzt. Erfolgte die Konstruktion der Mutageneseplasmide nach Strategie B, wurden sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende der PCR-Amplifikate I und II Schnittstellen generiert. Nach Reinigung der PCR-Produkte wurden diese einer Hydrolyse mit den beiden entsprechenden Restriktionsendonukleasen unterzogen und gemeinsam in pSWU41 ligiert.

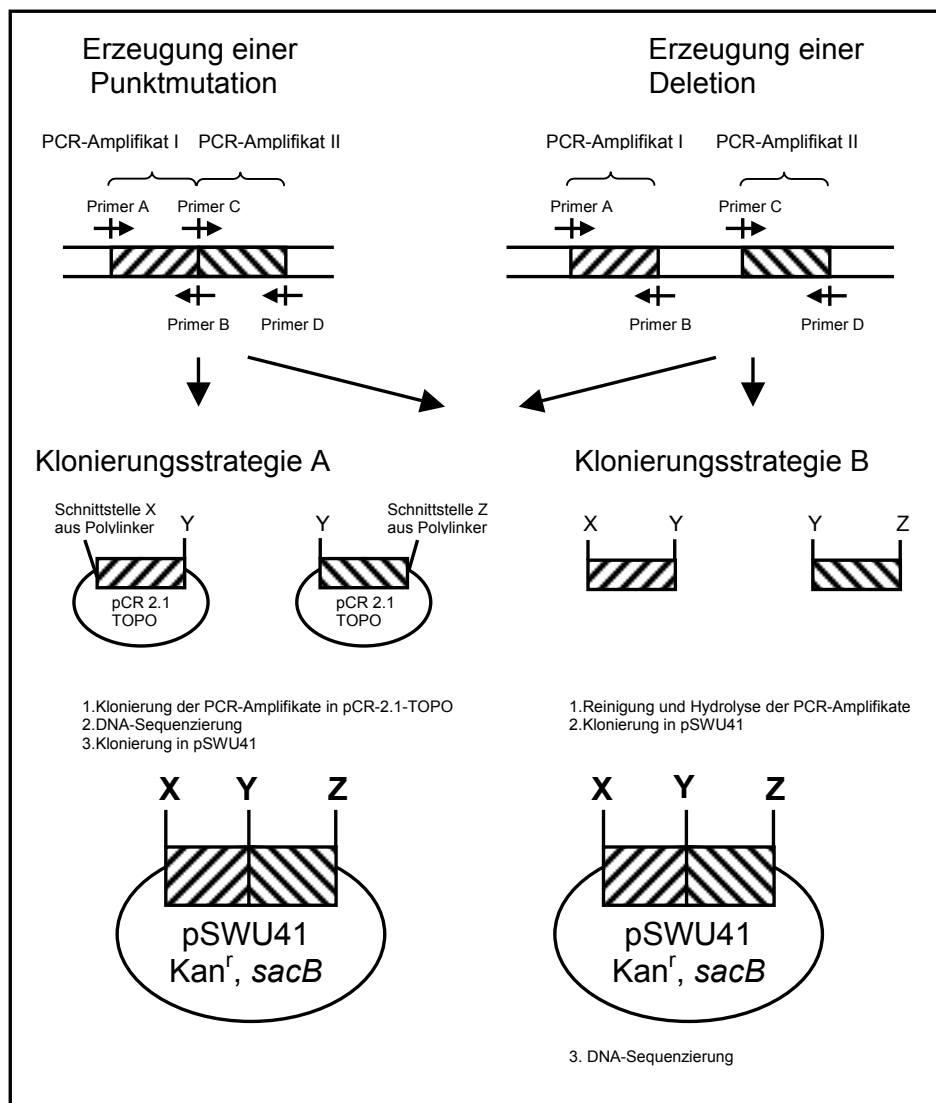


Abbildung 3.15 Die Klonierungsstrategien der erzeugten Mutageneseplasmide



Tabelle 3.4 fasst die zur Konstruktion der jeweiligen Mutageneseplasmide verwendeten Oligonukleotide A, B, C und D zusammen. Zusätzlich sind die für die Klonierung benutzten Schnittstellen X, Y und Z aufgelistet. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle 2.17 aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, diente Cosmid E25 als Matrize bei der PCR.

Tabelle 3.4 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutageneseplasmide

Mutagenese-plasmid	Klonierungs-strategie		Primerbezeichnung			Mutation von
pESW25	A	PrimerA	ERIMTABFOR	Schnittstelle X	<i>SacI</i>	MtaB KR1
		B	ERIMTABREV	Y	<i>StuI</i>	
		C	ERIIMTABFOR2	Y	<i>StuI</i>	
		D	ERIIMTABREV2	Z	<i>XbaI</i>	
pESW41	B	PrimerA	ENO1FOR	Schnittstelle X	<i>NotI</i>	MtaB ER*
		B	ENO2REV	Y	<i>SspI</i>	
		C	ENO3FOR	Y	<i>SspI</i>	
		D	ENO4REV	Z	<i>SpeI</i>	
pESW33	B	PrimerA	NADC1FOR	Schnittstelle X	<i>NotI</i>	MtaC Ox
		B	NADC2REV	Y	<i>BglII</i>	
		C	NADC3FOR	Y	<i>BglII</i>	
		D	NADC4REV	4	<i>SpeI</i>	
pESW36	B	PrimerA	NADD1FOR	Schnittstelle X	<i>NotI</i>	MtaD Ox
		B	NADD2REV	Y	<i>XhoI</i>	
		C	NADD3FOR	Y	<i>XhoI</i>	
		D	NADD4REV	Z	<i>SpeI</i>	
pESW45	B	PrimerA	METE1FOR	Schnittstelle X	<i>SacI</i>	MtaE OMT
		B	METE2REV	Y	<i>KpnI</i>	
		C	METE3FOR	Y	<i>KpnI</i>	
		D	METE4REV	Z	<i>XbaI</i>	
pESW17	A	PrimerA	SW1	Schnittstelle X	<i>SacI</i>	MtaF OMT
		B	SW2	Y	<i>KpnI</i>	
		C	SW3	Y	<i>KpnI</i>	
		D	SW4	Z	<i>SpeI</i>	
pESW24	A	PrimerA	MOX1	Schnittstelle X	<i>SacI</i>	MtaG MOX
		B	MOX2COR	Y	<i>SalI</i>	
		C	MOX3	Y	<i>SalI</i>	
		D	MOX4	Z	<i>XbaI</i>	
pESW64	A	PrimerA	ISO1FOR	Schnittstelle X	<i>SacI</i>	MtaH
		B	ISO2REV	Y	<i>PstI</i>	
		C	ISO3FOR	Y	<i>PstI</i>	
		D	ISO4REV	Z	<i>XbaI</i>	

### 3.8 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten Enoylreduktase Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB

Im ersten Modul von MtaB wurde eine Enoylreduktase Domäne vermutet. In dieser ist das von Katz und Mitarbeitern beschriebene hochkonservierte Motiv funktionaler ER Domänen abgewandelt (siehe Abbildung 3.16; (Kakavas *et al.*, 1997)). Um den

Einfluss der Enoylreduktase Domäne auf die Biosynthese zu untersuchen, wurden innerhalb der vermuteten NADPH-Bindestelle vier Aminosäuren ausgetauscht (siehe Abbildung 3.16). Die Substitution des Arginins durch Lysin betrifft dabei keinen der hochkonservierten Reste.

hochkonserviertes Teilmotiv

der NADPH Bindestelle

funktionaler ER Domänen

Originalsequenz in MtaB

die in der Mutante erzeugte Sequenz

	<b>L</b>	X	H	X	X	X	<b>G</b>	<b>G</b>	V	G	X	X	A
	TTG	CTC	CTG	GCG	GAT	CGT	GGC	GGT	CTG	GCC	GCA	CGG	CTT
	<b>L</b>	L	L	A	D	R	<b>G</b>	<b>G</b>	L	A	A	R	L
	<b>A</b>	L	L	A	D	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	L	A	A	R	L
	<b>GCC</b>	CTC	CTG	GCG	GAT	<b>AAG</b>	<b>GCC</b>	<b>TTG</b>	CTG	GCC	GCA	CGG	CTT

Abbildung 3.16 Die Punktmutationen innerhalb der vermuteten ER Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB. Die Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die mit Hilfe der Primer ERIMTABREV und ERIIMTABFOR2 (siehe Tabelle 2.17) erzeugten Mutationen sind fettgedruckt. Die mit Hilfe der PCR generierte *Stu*I-Schnittstelle ist unterstrichen dargestellt.

Da für den Reduktionsgrad der Ketidseitenkette des Myxothiazols an der zugehörigen Stelle keine ER Domäne nötig ist, wurde ursprünglich eine Beteiligung dieser Domäne an der Bildung der beiden Thiazolringe vermutet. Eine Inaktivierung hätte somit zu einem Thiazolin-Thiazol- (siehe Abbildung 3.17 A) oder einem Bisthiazolin-Myxothiazol (siehe Abbildung 3.17 B) führen können. Eine von der ER Domäne katalysierte Umlagerung der beiden Doppelbindungen in der Nonadienylseitenkette über einen Oxidations-Reduktionsmechanismus war ebenfalls denkbar. Folglich hätte nach der zweiten homologen Rekombination eine Mutante entstehen können, welche ein Myxothiazolderivat mit regulär gelagerten Doppelbindungen produziert (siehe Abbildung 3.17 C).

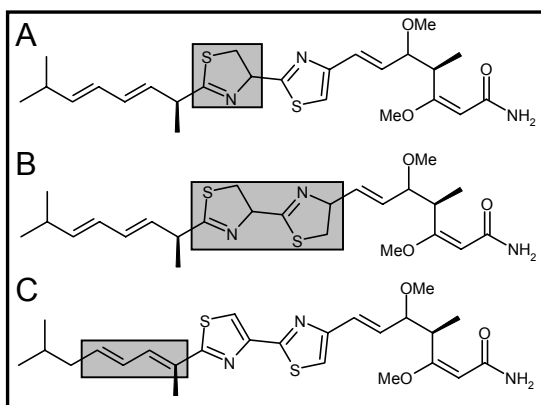


Abbildung 3.17 (A) Thiazolin-Thiazol Derivat des Myxothiazols; (B) Bisthiazolin Derivat des Myxothiazols; (C) Myxothiazol Derivat mit regulärer Lage der Doppelbindungen. Die Molekülbereiche, in denen sich die erwarteten Derivate von Myxothiazol unterscheiden, sind grau unterlegt. Erklärung siehe Text.

### 3.8.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW25

Zur Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW25 wurde die in Abbildung 3.15 dargestellte Klonierungsstrategie A modifiziert. Aus der Klonierung der PCR-Produkte in pCR-2.1-TOPO resultierten pESW14 (PCR-Amplifikat I) und pESW16 (PCR-Amplifikat II). Die Insert DNA aus pESW16 wurde durch Hydrolyse mit *Stu*I und *Spe*I gewonnen und mit dem gleichermaßen restringierten pESW14 ligiert. Aus dem resultierenden Plasmid pFGE10.2 wurde die Insert DNA mit *Sac*I und *Xba*I ausgeschnitten und mit dem *Sac*I/*Spe*I hydrolysierten pSWU41 ligiert, wobei Plasmid pESW25 erhalten wurde.

### 3.8.2 Konstruktion der *mtaB*-Mutante (L1666A, R1671K, G1672A, G1673L)

*S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde wie unter 2.15 beschrieben mit pESW25 transformiert. Die chromosomale DNA der resultierenden Kanamycin-resistenten Klone wurde isoliert und analysiert (siehe 2.8.1 und 2.14). Die Southern Blot Analyse zeigte für die Mutante ESW312 die ortsspezifische Integration von pESW25. Ausgehend von dieser genotypisch korrekten merodiploiden Mutante wurde, wie unter 2.15.4 beschrieben und in Abbildung 3.14 dargestellt, die Mutante ESW321 erzeugt, die

nach der zweiten homologen Rekombination die geplante Veränderung im Genotyp zeigte.

### 3.8.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die DAD gekoppelte HPLC Analyse zeigte, dass die Merodiploide ESW312 die Fähigkeit zur Myxothiazolbildung verloren hatte. Mit Hilfe der HPLC-MS Analyse (vergleiche 2.20.2) konnte in der Mutante ESW321 weder Myxothiazol (Masse (M) 487) noch das Thiazolin-Thiazol (M+2) bzw. ein Bisthiazolin-Derivat (M+4) detektiert werden. Die nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Revertanten produzierten alle wieder Myxothiazol und verifizieren somit die Methodik.

### 3.9 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der $\beta$ -Ketoreduktase Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB

Um zu testen, ob durch eine Punktmutation ein Myxothiazolderivat erzeugt werden kann, wurden innerhalb der NADPH-Bindestelle der KR Domäne von Modul 1 zwei hochkonservierte Glycinreste ausgetauscht (siehe Abbildung 3.18). Ähnliche Experimente zur Untersuchung der Erythromycinbiosynthese waren erfolgreich (Katz, 1997). Im Unterschied zu der in 3.8 beschriebenen Mutagenese ist die Aktivität dieser KR Domäne für die Myxothiazolbiosynthese unverzichtbar.

hochkonserviertes Teilmotiv

der NADPH Bindestelle

X X **G** X **G** X X **G** X X X **A**

in KR Domänen

Originalsequenz in MtaB

GTG GGT GGG CTC GGT GGC ATT GGC CTC GAG CTG GCC

V G **G** L **G** G I **G** L E L **A**

V **I** **I** L **V** G I G L E L A

die in der Mutante erzeugte Sequenz GTG **ATA ATA TTG** GTT GGC ATT GGC CTC GAG CTG GCC

Abbildung 3.18 Die Punktmutationen innerhalb der KR Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB. Die Aminosäuren, die mit der für KR Domänen definierten Konsensussequenz (Aparicio *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1998) übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die mit Hilfe der Primer ENO2REV und ENO3FOR (siehe Tabelle 2.17) erzeugten Mutationen sind fettgedruckt. Die für die genotypische Analyse generierte Sspl-Schnittstelle ist unterstrichen dargestellt.

In der Mutante müsste die Biogenese beim Verknüpfen der ersten Verlängerungseinheit mit der Startereinheit auf der Stufe eines Ketons stehen bleiben. Falls die nachfolgenden Domänen das veränderte Intermediat weiterprozessieren, sollte ein Myxothiazolderivat gebildet werden, das in Position 10 eine Ketogruppe statt einer Methingruppe trägt (siehe Abbildung 3.19). Zur Nummerierung des Myxothiazols siehe Abb. 1.

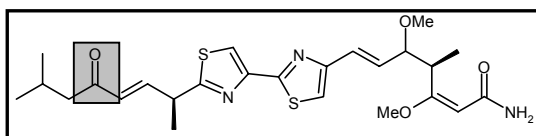


Abbildung 3.19 10-Ketoderivat des Myxothiazols. Der Molekülbereich, in dem sich das erwartete Derivat von Myxothiazol unterscheiden, ist grau unterlegt. Erklärung siehe Text.

### 3.9.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW41

Zur Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW41 wurden die PCR-Amplifikate I und II hydrolysiert und gemeinsam in pSWU41 kloniert (vergleiche Strategie B in Abbildung 3.15). Die verwendeten Oligonukleotide und die bei der Klonierung benutzten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Das Zusammenfügen der PCR-Produkte erfolgte über die generierte *Ssp*I-Schnittstelle.

### 3.9.2 Konstruktion der *mtaB*-Mutante (G1860I, G1861I, G1863V)

*S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde mit pESW41 transformiert (siehe 2.15). Nach der Isolation der chromosomalen DNA (siehe 2.8.1) aus den erhaltenen Transformanten wurde über Southern Blot Analyse (siehe 2.14) die ortsspezifische Integration von pESW41 nachgewiesen. Die merodiploide Mutante ESW380 zeigte dabei das Hybridisierungsmuster, welches für ein Einkreuzen des Mutageneseplasmides pESW41 im Bereich des PCR-Produktes I erwartet wurde. Aus dieser wurde durch zehntägige Passage ohne Kanamycin die Mutante ESW414 erzeugt. Durch Nachweis der generierten *Ssp*I-Schnittstelle wurde in der genotypischen Analyse dieser Mutante die geplante Veränderung im Chromosom bestätigt.

### 3.9.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die mit DAD gekoppelter HPLC durchgeführte phänotypische Analyse zeigte, dass die merodiploide Mutante ESW380 kein Myxothiazol mehr produzierte. Im Extrakt der Mutante ESW414 konnte mit Hilfe der HPLC-MS Analyse weder Myxothiazol noch das erwartete 10-Keto-Derivat detektiert werden. Die Revertante ESW415 produzierte wieder Myxothiazol.

## 3.10 Untersuchungen zur Bildung der Bisthiazoleinheit im Myxothiazol

Um zu testen, ob die Domänen mit Ähnlichkeiten zu FMN-Bindeproteinen für die Oxidation der vermutlich intermediär auftretenden Thiazolinringe verantwortlich sind, wurden die für diese Domänen kodierenden Genabschnitte unter Erhalt des Leserahmens deletiert.

### 3.10.1 Deletion der FMN-Bindedomäne in MtaC

Marahiel und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sich die für die Konstruktion von Hybrid-Proteinen optimale Fusionsstelle 34 bis 39 Aminosäuren N-terminal vom hochkonservierten Serin der PCP Domäne befindet (Mootz *et al.*, 2000). Die Sequenz des Primers NADC2REV (siehe Abbildung 3.20) wurde deshalb so gewählt, dass die 41 auf das hochkonservierte Serin folgenden Aminosäuren erhalten bleiben. Für das korrekte Weiterprozessieren von Intermediaten durch Polyketidsynthasen sind sogenannte Interpolypeptid-Linker nötig, über welche die biosynthetisierenden Proteine miteinander in Wechselwirkung treten (Gokhale & Khosla, 2000; Tsuji *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001). Diese Linker-Regionen sind wenig konserviert und bis zu 100 Aminosäuren lang. Von der Existenz ähnlicher Linker in NRPSs muss ausgegangen werden, weshalb der Primer NADC3FOR (siehe Abbildung 3.20) so synthetisiert wurde, dass die 18 C-terminalen Aminosäuren von MtaC nicht deletiert werden.

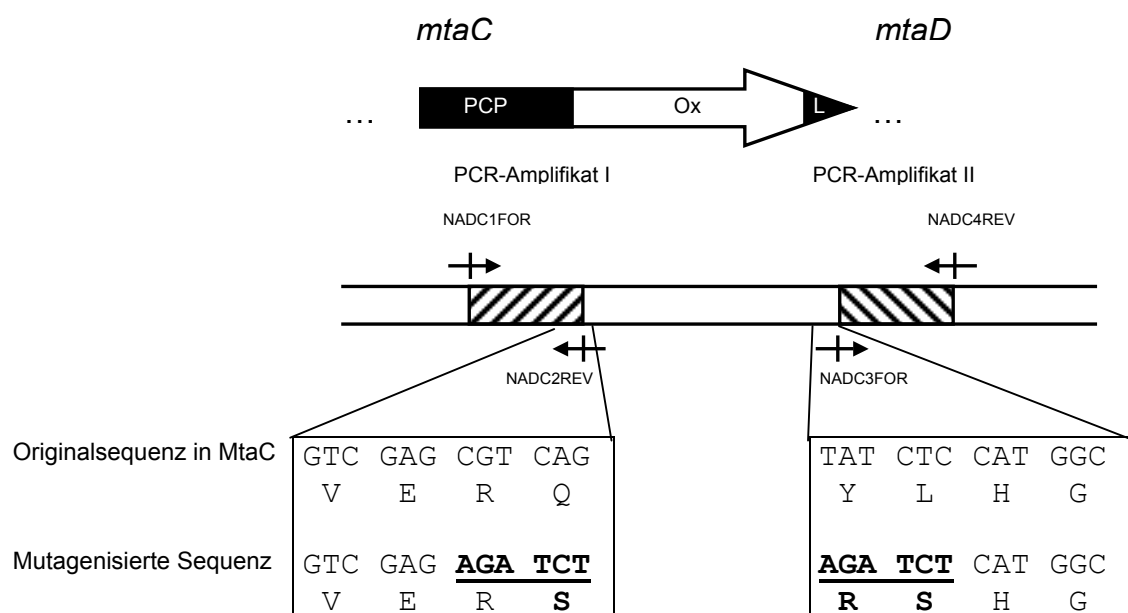


Abbildung 3.20 Strategie zur Deletion der Ox Domäne von MtaC. Mutagenisierte Aminosäuren bzw. Nukleotide sind fettgedruckt. Die generierte *Bgl*II-Schnittstelle ist unterstrichen dargestellt. Der deletierte Bereich umfasst 645 bp.

Sollte nach der Deletion des für die FMN-Bindedomäne kodierenden Genabschnittes die Bildung des ersten Heterozyklus auf der Stufe eines Thiazolinringes stehen bleiben, so müsste als Produkt der Mutante ein Thiazolin-Thiazol-Derivat des Myxothiazols nachzuweisen sein (siehe Abbildung 3.21).

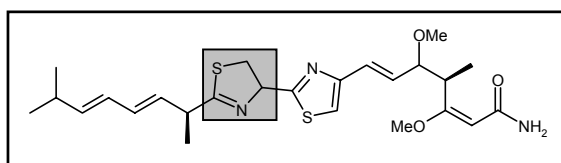


Abbildung 3.21 Thiazolin-Thiazol-Derivat des Myxothiazols. Der Molekülbereich, in dem sich das erwartete Derivat von Myxothiazol unterscheiden, ist grau unterlegt. Erklärung siehe Text.

### 3.10.1.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW33

Als Beispiel für die nach Strategie B konstruierten Mutageneseplasmide soll die Klonierung von pESW33 detailliert beschrieben werden. Mit dem Primerpaar NADC1FOR/NADC2REV wurde von Cosmid E25 ein 604 bp großes PCR-Produkt mit *Pfu*-Polymerase (Stratagene) generiert. Mit der Primerkombination NADC3FOR/NADC4REV wurde unter den gleichen Bedingungen ein 600 bp großes PCR-Produkt erzeugt. Nach Reinigung der beiden PCR-Fragmente, wie unter 2.8.3

beschrieben, wurde das 604 bp PCR-Amplifikat mit den Enzymen *NotI* und *BglII* hydrolysiert. Das 600 bp Amplifikat wurde einer Restriktion mit *BglII* und *SpeI* unterzogen. In einer unidirektionellen Klonierung wurden beide Fragmente mit dem zuvor mit *NotI* und *SpeI* restringierten Vektor pSWU41 (Wu & Kaiser, 1996) ligiert. Es resultierte das Plasmid pESW33. Nach erfolgter Restriktionsanalyse wurde durch DNA-Sequenzierung gezeigt, dass die Sequenz bis auf die geplanten Mutationen mit der Ausgangssequenz übereinstimmte.

#### **3.10.1.2 Konstruktion der *mtaCΔOx<sub>3280-3919</sub>* Mutante**

Der Wildtyp von *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde mit pESW33 transformiert (siehe 2.15). Die chromosomale DNA der resultierenden Kanamycin-resistenten Klone wurde isoliert und genotypisch analysiert. Dazu wurde diese mit *BamHI/BglII* hydrolysiert und wie unter 2.14 beschrieben gegen das DIG-markierte Insert aus pESW33 hybridisiert. Die merodiploide Mutante ESW368 zeigte das Signalmuster, das für eine Integration von pESW33 in das Chromosom im Bereich des PCR-Produktes II vorhergesagt wurde (siehe Abbildung 3.22). Ausgehend von dieser genotypisch korrekten merodiploiden Mutante wurde, wie unter 2.15.4 beschrieben, die Mutante ESW400 generiert, die nach der zweiten homologen Rekombination die Deletion aufwies.



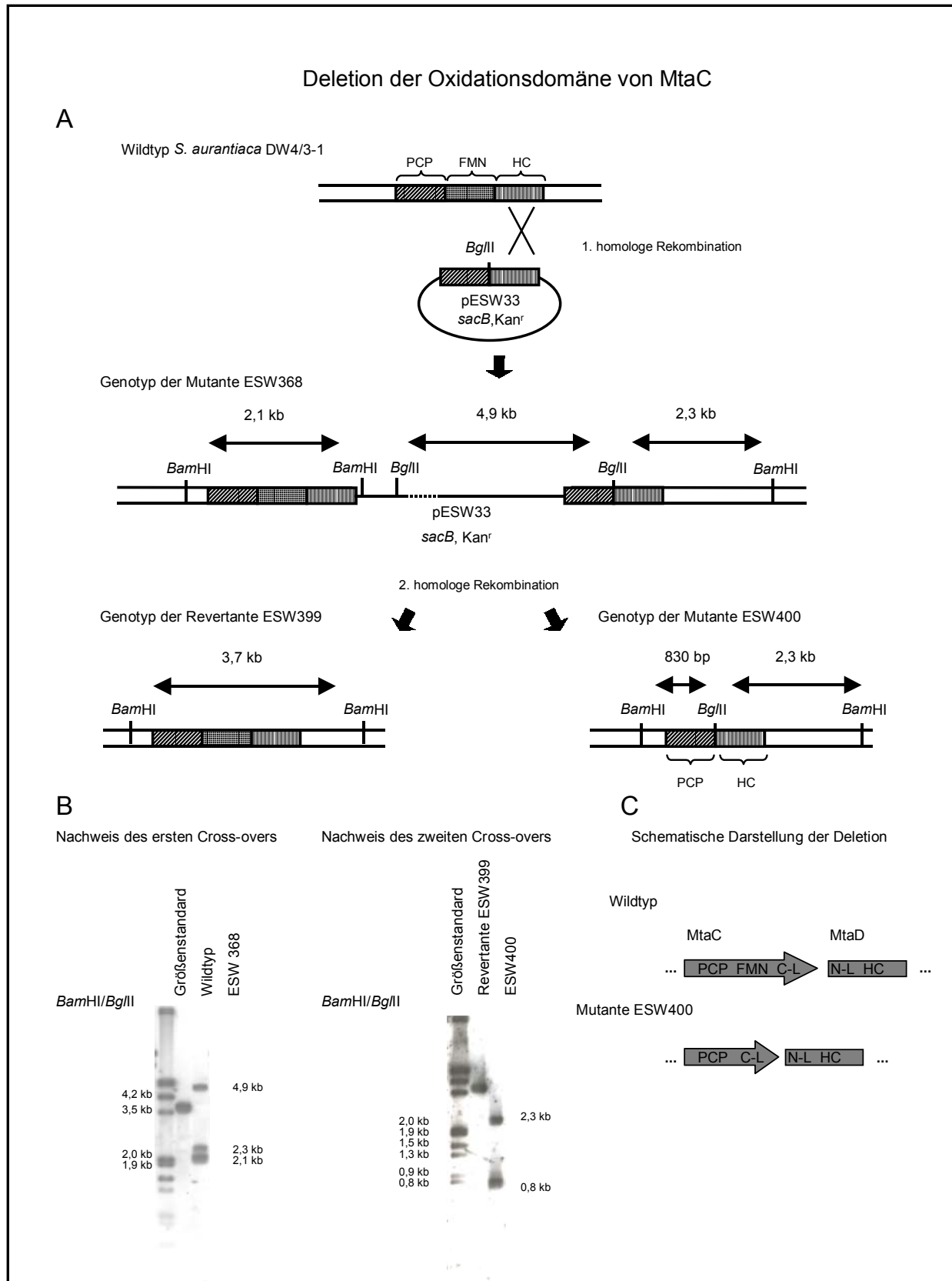


Abbildung 3.22 Deletion der Oxidationsdomäne von MtaC. (A) Die Mutagenese beginnt mit der Integration von pESW33 in das Chromosom von *S. aurantiaca* DW4/3-1. Daraus resultiert die merodiploide Mutante ESW368, deren Genotyp abgebildet ist. Die in der Southern Blot Analyse gefundenen Fragmentgrößen sind mit Pfeilen markiert. Bei dem Auskreuzen des Mutageneseplasmides sind zwei Genotypen möglich. Links dargestellt ist die Revertante ESW399,

deren Genotyp dem des Wildtypen entspricht. Der Genotyp der Deletionsmutante ESW400 ist rechts dargestellt. (B) Die Abbildung zeigt die Southern Blot Analyse von ESW368, ESW399, ESW400 und *S. aurantiaca* DW4/3-1 im Vergleich mit dem DIG-markierten DNA-Größenstandard der Fa. Roche Diagnostics. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben. Als Gensonde diente das Insert von pESW33. (C) Die Abbildung zeigt den C-terminalen Teil von MtaC und den N-terminalen Teil von MtaD des Wildtypen bzw. der Deletionsmutante ESW400 (C-L: C-terminaler Linkerbereich; N-L: N-terminaler Linkerbereich).

Zusätzlich zur Southern Blot Analyse wurde eine PCR-Analyse mit den Mutageneseprimern NADC1FOR und NADC4REV durchgeführt. Die DNA des Wildtyps von *S. aurantiaca* DW4/3-1 lieferte das erwartete 1849 bp große PCR-Produkt. Im Gegensatz dazu konnte vom Chromosom der Mutante ESW400 aufgrund der Deletion nur ein 1204 bp großes PCR-Fragment erzeugt werden.

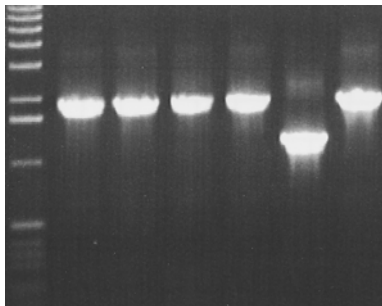


Abbildung 3.23 PCR-Analyse der nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Mutanten. Spur 1: DNA-Größenstandard der Fa. NEB, Spuren 2 bis 5: Revertanten; Spur 6: Mutante ESW 400; Spur 7: Wildtyp *S. aurantiaca* DW4/3-1

### 3.10.1.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die mit Hilfe DAD gekoppelter HPLC durchgeführte phänotypische Analyse der Mutanten zeigte, dass keine der merodiploiden Mutanten Myxothiazol bildet. Die nach der Deletion der Oxidationsdomäne in MtaC erhaltene Mutante ESW400 produzierte Myxothiazol. Im Extrakt dieser Mutante war das erwartete Thiazolin-Thiazol-Derivat mit Hilfe der HPLC-MS Analyse nicht nachweisbar. Wie bei den unter 3.8 und 3.9 beschriebenen Mutagenesen produzierten die erzeugten Revertanten ebenfalls wieder Myxothiazol.

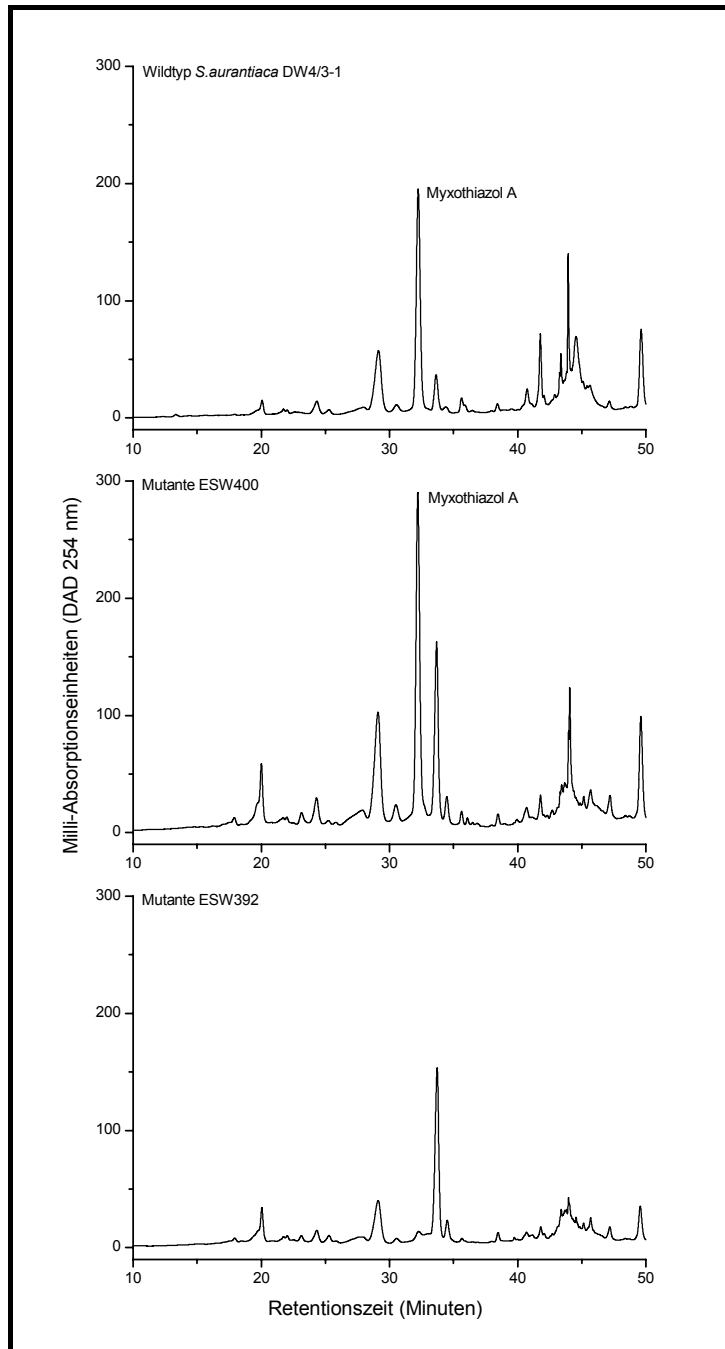


Abbildung 3.24 HPLC Analyse der Extrakte von *S. aurantiaca* DW4/3-1, der Mutante ESW400 und der Mutante ESW392 (siehe 3.10.2).

### 3.10.2 Deletion der FMN-Bindedomäne in MtaD

Da die potentielle Oxidationsdomäne von MtaD zwischen den hochkonservierten Motiven A8 und A9 der Adenylierungsdomäne (Konz & Marahiel, 1999) inseriert ist, war die Festlegung des zu deletierenden Genabschnittes durch Datenbankvergleiche

mit Adenylierungsdomänen ohne eine solche Insertion gut möglich. Die Strategie zur Deletion der Ox Domäne von MtaD war analog zur der unter 3.10.1 beschriebenen. Da sowohl MtaC als auch MtaD eine mögliche Oxidationsdomäne enthalten, wurde zu Beginn der Arbeiten vermutet, dass jede für die Oxidation je eines intermediären Thiazolinringes nötig ist. Deshalb hätte nach der zweiten homologen Rekombination eine Mutante entstehen können, welche ein Thiazol-Thiazolin-Derivat des Myxothiazols produziert (siehe Abbildung 3.25).

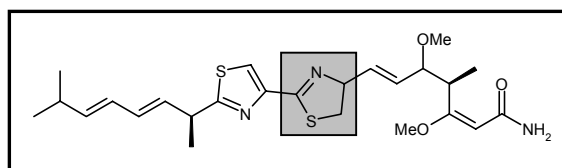


Abbildung 3.25 Thiazol-Thiazolin-Derivat des Myxothiazols. Der Molekülbereich, in dem sich das Derivat von Myxothiazol unterscheidet, ist grau unterlegt. Erklärung siehe Text.

### 3.10.2.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW36

Die Konstruktion des Plasmides pESW36 erfolgte analog zur Klonierung von pESW33. Die eingesetzten Oligonukleotide und PCR-generierten Schnittstellen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

### 3.10.2.2 Konstruktion der *mtaD* $\Delta$ Ox<sub>3599-4430</sub> Mutante

Elektrokompetente Zellen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurden wie unter 2.15 beschrieben mit pESW36 transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurde durch Southern Blot Analyse genotypisch verifiziert (siehe vorangegangene Kapitel). Die chromosomale DNA der merodiploiden Mutante ESW371 lieferte Signale, die für eine Kointegratbildung im Bereich des PCR-Amplifikates I errechnet wurden. Nach Wegfall des Selektionsdruckes führte die zweite homologe Rekombination zur Mutante ESW392, in welcher die geplante Deletion mit Hilfe der Southern Blot Analyse nachgewiesen wurde.

### 3.10.2.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die mit Hilfe der DAD gekoppelten HPLC durchgeführte phänotypische Analyse zeigte, dass keine der Merodiploiden mehr Myxothiazol bilden konnte. Im Extrakt der nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Deletionsmutante ESW392 konnte mit Hilfe der HPLC-MS Analyse weder das erwartete Thiazol-Thiazolin-Derivat noch Myxothiazol nachgewiesen werden. Die mit Hilfe der DAD gekoppelten HPLC durchgeführte phänotypische Analyse von ESW392 ist in Abbildung 3.24 dargestellt. Die bei dieser Mutagenese erzeugten Revertanten produzierten wieder Myxothiazol.

### 3.11 *In vitro* Untersuchungen zur Entstehung der Bisthiazoleinheit

Mit den *in vivo* Experimenten konnte die Funktion der möglichen Ox Domänen von MtaC und MtaD nicht aufgeklärt werden. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Ox Domäne von MtaC verzichtbar ist, sollten die beiden Domänen als separate Proteine in *E. coli* heterolog exprimiert, gereinigt und nachfolgend einem Aktivitätstest unterzogen werden. Um die Reinigung zu erleichtern, war vorgesehen, die beiden Domänen unter Verwendung des IMPACT™ One-Step Protein Purification Systems der Fa. NEB als Intein-Chitinbindedomänen-Fusionsproteine zu exprimieren (siehe 2.19.4). Die für die beiden Ox Domänen kodierenden Genabschnitte wurden als *NdeI/EcoRI*-Fragmente in pCYB2 kloniert (siehe unten). Daraus resultiert eine künstliche Extension beider Proteine am C-Terminus um Glutaminsäure, Phenylalanin, Leucin, Glutaminsäure, Prolin und Glycin (vergleiche hierzu 2.19.4). Mit der Primerkombination EXPMTACFMN1/2 und EXPMTADFMN1/2 wurden die für die Ox Domänen von MtaC (712 bp) und MtaD (830 bp) kodierenden Abschnitte unter Verwendung von *Pfu* DNA Polymerase ausgehend von Cosmid E25 amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte wurden gemäß Herstellerprotokoll in pCR2.1-TOPO kloniert, woraus die Plasmide pE25/800-2 und pE25/700-1 resultierten. Die Inserts beider Klone wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Das 830 bp *NdeI/EcoRI*-Restriktionsfragment und das 712 bp *NdeI/EcoRI*-Restriktionsfragment wurden in den gleichermaßen hydrolysierten pCYB2 kloniert. Dabei wurden die Plasmide pESW109 (enthält das 830 bp Insert) und pESW113 (enthält das 712 bp Insert) erhalten. Diese wurden für die Expressionsversuche in *E.*

*coli* XL-1-Blue elektroporiert. Für die Ox Domäne von MtaC wurde (einschließlich der sechs vom Polylinkerbereich kodierten Aminosäuren) eine Größe von 26 382,81 Da errechnet. Die vorhergesagte Größe der Ox Domäne von MtaD betrug 30 379,96 Da. Die Ox Domäne von MtaD konnte unter den getesteten Bedingungen nicht in löslicher Form exprimiert werden. Dabei wurden das Medium (LB, 2YT etc.), die zur Induktion eingesetzte IPTG-Menge und die Temperatur variiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung.

Unter den folgenden Bedingungen konnte die Ox Domäne von MtaC in löslicher Form exprimiert werden: Die mit pESW113 transformierten *E. coli* XL-1-Blue Zellen wurden in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Nach der Induktion mit 0,1 mM IPTG wurde die Temperatur auf 20°C reduziert. Anschließend wurden die Kulturen für 20 h inkubiert. Nach der Zellernte (20 min bei 4000 rpm) wurden die Zellen gewaschen und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (siehe 2.19.1). Das Zellysat wurde 15 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand (= lösliche Fraktion) wurde das Zielprotein gemäß dem von der Fa. NEB vorgeschlagenen Reinigungsprotokoll affinitätschromatographisch gereinigt. Nach dem Ankonzentrieren mit Hilfe von Amicon-Konzentratoren war das Eluat intensiv gelb gefärbt. Dies kann als Hinweis auf FMN als gebundenen Cofaktor gewertet werden.

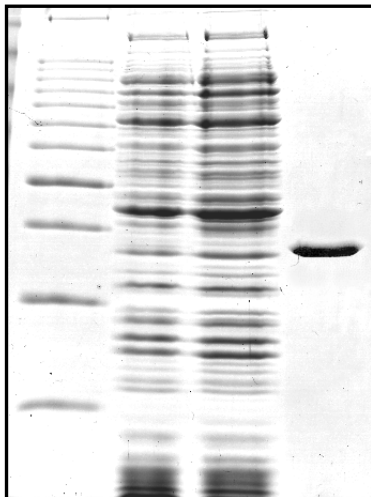


Abbildung 3.26 SDS PAGE Gel der gereinigten OX Domäne von MtaC. Spur 1: Protein-Größenstandard; Spur 2: lösliche Fraktion vor der Induktion mit IPTG; Spur 3: lösliche Fraktion nach zwanzigstündiger Inkubation bei 20°C; Spur 4: gereinigte und ankonzentrierte Ox Domäne von MtaC.

Zur Kontrolle wurde das Protein N-terminal ansequenziert. Die dabei ermittelten Aminosäuren stimmten mit den N-terminalen Aminosäuren der Ox Domäne überein. Die exakte Bestimmung der Proteingröße wurde mittels MALDI-TOF durchgeführt. Es wurde eine Masse von 26 316,47 Da gemessen, die um 2,5 ‰ von der errechneten Masse abweicht. Ein weiteres Signal, das Rückschlüsse auf die Masse des gebundenen Cofaktors ermöglicht hätte, konnte nicht detektiert werden. Um weitere Hinweise auf die Natur des Cofaktors zu erhalten, wurde das Protein eluat für 1,5 min aufgekocht und anschließend 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein UV-Spektrum von 300-600 nm aufgenommen. Die hier gemessenen Absorptionsmaxima von 375 und 450 nm stimmen mit den Literaturwerten von FMN überein.

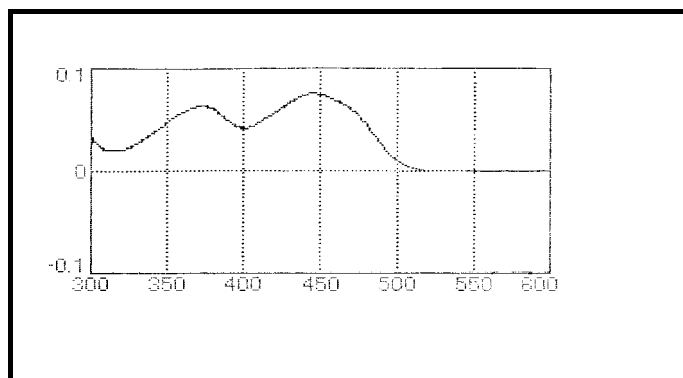


Abbildung 3.27 UV Spektrum des Cofaktors der Ox Domäne von MtaC.

### 3.11.1 *In vitro* Test mit der Ox Domäne von MtaC

Es sollte überprüft werden, ob die Ox Domäne von MtaC in der Lage ist, ein Thiazolin-Derivat zum Thiazol zu oxidieren. Ein Thiazolin-Thiazol Myxothiazol stand als Substrat nicht zur Verfügung. Deshalb dienten die Melithiazole K und L, die beide ein solches Heterozyklensystem enthalten, als Alternativen (siehe Abbildung 3.28). Um FMN zu regenerieren, wurde dem Reaktionsansatz  $\text{NAD}^+$  zugesetzt.

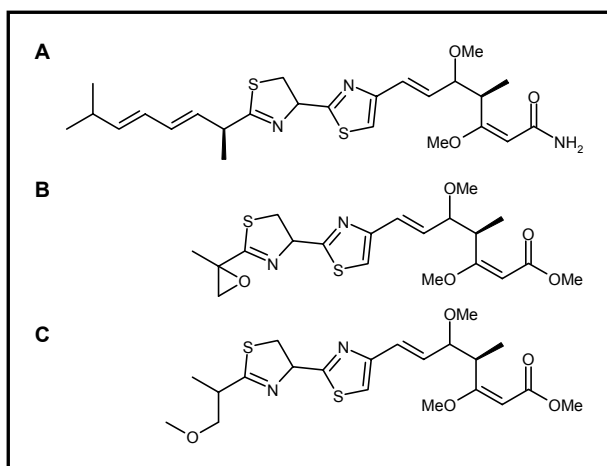


Abbildung 3.28 (A) zeigt das Thiazolin-Thiazol Myxothiazol, das nicht zur Verfügung stand. (B) zeigt Melithiazol K. In (C) ist Melithiazol L dargestellt.

Aus der Zellmasse von 1 l Kultur konnten, wie unter 2.19.4 beschrieben, 418  $\mu\text{g}$  der Ox Domäne von MtaC isoliert werden. Das Protein-Isolat wurde wie unter 2.19.3 beschrieben auf ein Volumen von 55  $\mu\text{l}$  mit einer Konzentration von 7,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingengt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 3.5 beschrieben zusammen.

Tabelle 3.5 Zusammensetzung der *in vitro* Reaktion.

	Konzentration der Stocklösung	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
$\text{NAD}^+$	15 mM	10 $\mu\text{l}$	1,5 mM
gereinigtes Protein	7,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,18 $\mu\text{l}$	500 nM
Melithiazol K bzw. L	1,15 mM	20 $\mu\text{l}$	0,23 mM
Puffer A bzw. B		ad 100 $\mu\text{l}$	

Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert. Nach 0 h; 0,25 h; 1 h; 4 h und 12 h wurden 20  $\mu\text{l}$  entnommen und bis zur HPLC-Analyse bei -20°C eingefroren. Zur Proteininaktivierung wurde kurz aufgekocht. Anschließend wurde 30 sec bei 13 000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 10  $\mu\text{l}$  zur HPLC Analyse genutzt.



Tabelle 3.6 Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Puffer A	Puffer B
25 mM Tris-HCl	25 mM Tris-HCl
50 mM NaCl	50 mM NaCl
pH 8,0	pH 7,5

Bei Puffer A handelt es sich um den von der Fa. NEB vorgeschlagenen Spaltungspuffer. Zusätzlich wurde der Aktivitätstest bei pH 7,5 durchgeführt.

Melithiazole mit einer Bisthiazoleinheit besitzen im Vergleich zu Thiazolin-Thiazol-Melithiazolen ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 307 nm (Bohlendorf *et al.*, 1999). Eine solche Veränderung des UV-Spektrums konnte in der DAD gekoppelten HPLC Analyse der Reaktionsansätze nicht beobachtet werden.

### **3.12 Spezifische Inaktivierung der O-Methyltransferase Domänen in MtaE und MtaF**

Um die postulierte Funktion der O-MT Domänen von MtaE und MtaF zu bestätigen, sollten innerhalb des hochkonservierten Motives I der SAM-Bindestelle (siehe Abbildung 3.29) Punktmutationen erzeugt werden.

#### **3.12.1 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten O-Methyltransferase Domäne von MtaE**

Zur gezielten Inaktivierung wurde innerhalb der SAM-Bindungsfalte das hochkonservierte Aspartat gegen Alanin ausgetauscht. Zusätzlich wurde Cystein durch Threonin ersetzt.

hochkonserviertes Motiv I SAM-abhängiger MTs

<b>D</b>	X	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	X	G
GAC	TTC	GGG	TGC	GGG	TAT	GCC

Originalsequenz in MtaE

<b>D</b>	F	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	Y	A
<b>A</b>	F	G	<b>T</b>	G	Y	A

die in der Mutante erzeugte Sequenz

GCG	TTC	<u>GGT</u>	<u>ACC</u>	GGG	TAT	GCC
-----	-----	------------	------------	-----	-----	-----

Abbildung 3.29 Die Punktmutationen innerhalb der O-MT Domäne von MtaE. Die Aminosäuren, die mit dem hochkonservierten Motiv I (Kagan & Clarke, 1994) übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die fettgedruckten Aminosäuren bzw. Nukleotide wurden mutagenisiert. Die generierte *KpnI*-Schnittstelle ist unterstrichen dargestellt.

Es wurde erwartet, dass nach der zweiten homologen Rekombination eine Mutante entsteht, die zur Methylierung der an C18 befindlichen Hydroxygruppe nicht mehr fähig ist. Das erwartete 18-Desmethyl-Myxothiazol ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

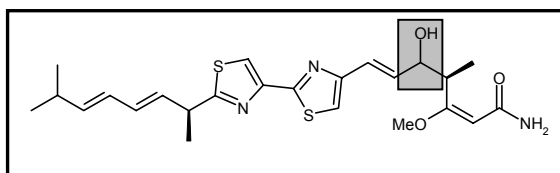


Abbildung 3.30 18-Desmethyl-Myxothiazol. Der Molekülbereich, in dem sich das Derivat von Myxothiazol unterscheidet, ist grau unterlegt. Erklärung siehe Text.

### 3.12.1.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW45

Gemäß der in Abbildung 3.15 dargestellten Strategie B wurde Plasmid pESW45 konstruiert. Die dabei verwendeten Oligonukleotide und die mit Hilfe der PCR erzeugten Restriktionsschnittstellen sind Tabelle 3.4 zu entnehmen.

### 3.12.1.2 Konstruktion der *mtaE* Mutante (D1042A; C1045T)

Elektrokompetente Zellen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurden mit Plasmid pESW45 wie unter 2.15 beschrieben transformiert. Von den erzeugten Transformanten wurde für die merodiploide Mutante ESW385 durch Southern Blot Analyse (siehe 2.14) die ortsspezifische Integration von pESW45 gezeigt. Von dieser Merodiploiden wurde, wie unter 2.15.4 beschrieben, die Mutante ESW409 abgeleitet, die in der genotypischen Analyse die geplante Veränderung zeigte.

### 3.12.1.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die mit Hilfe der DAD gekoppelten HPLC durchgeführte phänotypische Analyse zeigte, dass die Merodiploide ESW385 kein Myxothiazol mehr bildete. In der HPLC-MS Analyse konnte im Extrakt der Mutante ESW409 weder Myxothiazol noch das erwartete 18-Desmethyl-Myxothiazol detektiert werden. Die nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Revertanten produzierten wieder Myxothiazol und verifizieren somit die Methodik.

### 3.12.2 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten O-Methyltransferase Domäne von MtaF

In analoger Weise wurden im hochkonservierten Motiv I der SAM-Bindestelle (Kagan & Clarke, 1994) der potentiellen O-Methyltransferase Domäne von MtaF drei Aminosäuren ausgetauscht.

hochkonserviertes Motiv I SAM-abhängiger MTs

D	X	G	C	G	X	G
GAC	ATC	GGG	TGT	GGC	CAC	TCG

Originalsequenz in MtaF

D	I	G	C	G	H	S
L	I	G	T	L	H	S

erzeugte Sequenz in der Mutante

CTC	ATC	<u>GGT</u>	<u>ACC</u>	CTC	CAC	TCG
-----	-----	------------	------------	-----	-----	-----

Abbildung 3.31 Die Punktmutationen innerhalb der O-MT Domäne von MtaF. Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit dem hochkonservierten Motiv I von SAM-Bindestellen überein. Die fettgedruckten Aminosäuren bzw. Nukleotide wurden mutagenisiert. Die generierte *KpnI*-Schnittstelle ist unterstrichen dargestellt.

Nach der zweiten homologen Rekombination sollte eine Mutante entstehen, die ein 20-Desmethylderivat von Myxothiazol produziert.

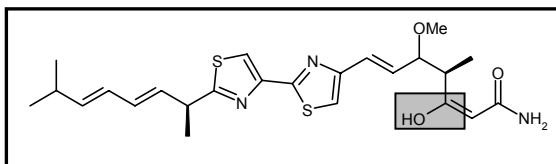


Abbildung 3.32 20-Desmethyl-Myxothiazol. Der Molekülbereich, in dem sich das Derivat von Myxothiazol unterscheidet, ist grau unterlegt. Erklärung siehe Text.

### 3.12.2.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW17

Die Konstruktion von Plasmid pESW17 erfolgte nach der in Abbildung 3.15 beschriebenen Strategie A. Das Zusammenfügen der beiden PCR-Produkte erfolgte in diesem Fall über eine *KpnI*-Schnittstelle.

### 3.12.2.2 Konstruktion der *mtaF*- Mutante (D1002L; C1005T; G1006L)

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation von pESW17 in *S. aurantiaca* DW4/3-1 und anschließende Selektion mit Kanamycin. In der resultierenden Mutante ESW21/1 wurde die korrekte Integration des Mutageneseplasmides im genomischen Southern Blot überprüft. Aus ESW21/1 wurde durch Passage ohne Kanamycin und Selektion gegen Saccharose die Mutante ERM4 erzeugt. Deren veränderter Genotyp wurde mittels Southern Blot Analyse bestätigt.

### 3.12.2.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

In der DAD gekoppelten HPLC-Analyse waren alle merodiploiden Mutanten Myxothiazol-negativ. Von den aus ESW21/1 durch zweites Cross-over hervorgegangenen Mutanten produzierte lediglich die Revertante ERM3 Myxothiazol. Die Mutante ERM4 mit der gewünschten Veränderung im Chromosom war Myxothiazol-negativ.

Letztere wurde einer weiteren Analyse mit der HPLC-MS unterzogen. In den Extrakten wurde nach der Masse des Desmethylderivates (M 472+1) und der Masse des in Abbildung 3.33 dargestellten Methylketons (M 430+1) gesucht. Dieses kann entstehen, wenn das an der ACP Domäne von MtaF befindliche  $\beta$ -Ketosäure-Intermediat durch Hydrolyse freigesetzt wird und anschließend decarboxyliert. Weder diese beiden Substanzen noch Substanzen mit einem dem Myxothiazol-ähnlichen UV-Spektrum konnten nachgewiesen werden.

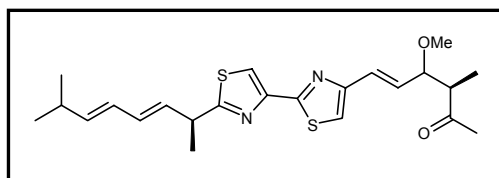


Abbildung 3.33 Durch Hydrolyse und Decarboxylierung möglicherweise entstehendes Methylketon

### 3.13 Untersuchungen zur Entstehung des endständigen Amides

In der Adenylierungsdomäne von MtaG ist zwischen den hochkonservierten Motiven A4 und A5 (Konz & Marahiel, 1999) eine MOX Domäne inseriert. Es wurde vermutet, dass diese an der Bildung des Säureamides beteiligt ist. Der mögliche Mechanismus der Amidbildung wird in 4.2 eingehend diskutiert. Zunächst müsste das am ACP von MtaF befindliche Intermediat jedoch mit einer (zu Beginn der Arbeiten noch unbekannten) Aminosäure durch die A Domäne von MtaG verknüpft werden. Um den Einfluss der MOX Domäne auf die Myxothiazolbiosynthese zu untersuchen und möglicherweise die Aminosäure, die den Amidstickstoff liefert, zu identifizieren, sollte der für diese Domäne kodierende Genabschnitt unter Erhalt des Leserahmens deletiert werden.

#### 3.13.1 Deletion der Monooxygenasedomäne in MtaG

Da in der Literatur für in A Domänen inserierte MOX Domänen bisher keine Konsensusbereiche definiert worden sind, wurde der gesamte für die MOX Domäne kodierende Bereich unter Erhalt des Leserahmens durch zweifache homologe Rekombination deletiert. Dabei wurden durch Sequenzvergleich mit den Adenylierungsdomänen von MtaC und MtaD hypothetisch die Grenzen der MOX Domäne festgelegt. Die Strategie, die zur Deletion der MOX Domäne von MtaG verfolgt wurde, ist analog zu der unter 3.10.1 beschriebenen.

Nach der zweiten homologen Rekombination sollte eine Mutante entstehen, die ein um eine Aminosäure extendiertes „überfertiges“ Myxothiazol produziert. Am wahrscheinlichsten schienen die Aminosäuren Glycin, Serin und Alanin (siehe 4.2 und 4.4.4).

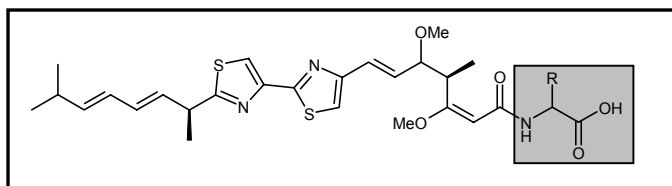


Abbildung 3.34 Die für die Deletion der MOX Domäne von MtaG erwarteten Myxothiazolderivate. R:-H Glycin; R:-CH<sub>2</sub>OH Serin; R:-CH<sub>3</sub> Alanin (siehe hierzu 4.4.4)

### 3.13.1.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW24

Plasmid pESW24 wurde nach der in Abbildung 3.15 dargestellten Strategie A konstruiert. In der PCR mit dem Primerpaar MOX1/MOX2 diente Plasmid pESW8 als Matrize, während für die Amplifikation mit den Primern MOX3/MOX4 Cosmid E201 als Template-DNA eingesetzt wurde.

### 3.13.1.2 Konstruktion der *mtaG*ΔMOX<sub>2284-3324</sub> Mutante

*S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde mit Plasmid pESW24 transformiert. Der korrekte Genotyp der erzeugten Transformanten wurde durch Southern Blot Analyse bestätigt. Nach der bereits beschriebenen Vorgehensweise wurde von der Merodiploiden ESW303 die Mutante ESW331 abgeleitet, die in der genotypischen Analyse die gewünschte Veränderung im Chromosom zeigte.

### 3.13.1.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die Mutante ESW303 mit integriertem pESW24 war in der mit DAD-HPLC durchgeführten phänotypischen Analyse Myxothiazol-negativ. Der methanolische Extrakt der Mutante ESW331 wurde in der HPLC-MS Analyse auf Myxothiazoladdukte mit Glycin, Serin und Alanin hin untersucht. Diese konnten nicht nachgewiesen werden. Die nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Revertanten produzierten alle wieder Myxothiazol.

### 3.14 Inaktivierung von *mtaH* sowohl durch einfache homologe Rekombination als auch durch In-Frame Deletion

Stromabwärts von *mtaG* lässt sich über Datenbankvergleiche ein ORF mit Ähnlichkeiten zu Heptadienisomerasen (HDI) identifizieren. Da *mtaG* und *mtaH* in die gleiche Richtung transkribiert werden und zwischen dem Stopcodon von *mtaG* und Startcodon von *mtaH* lediglich 15 bp liegen, wurde vermutet, dass MtaH an der Myxothiazolbiosynthese beteiligt ist. Die Doppelbindungen innerhalb der Nonadienylseitenkette von Myxothiazol befinden sich nicht wie bei Polyketiden üblich zwischen den verknüpften Ketideinheiten ("irreguläre" Lage). Deshalb schien eine von MtaH katalysierte Umlagerung der Doppelbindungen denkbar. Eine *mtaH* Mutante sollte folglich ein Myxothiazolderivat produzieren, in dem sich die Doppelbindungen in der "regulären" Lage befinden.

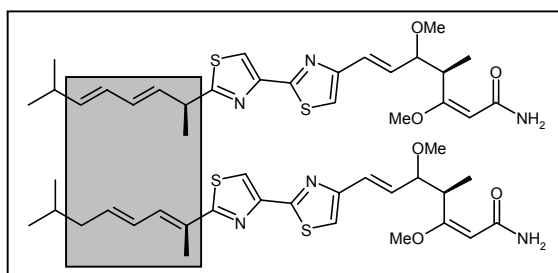


Abbildung 3.35 Oben dargestellt ist Myxothiazol mit der tatsächlichen ("irregulären") Lage der Doppelbindungen innerhalb der Nonadienylseitenkette. Die untere Hälfte zeigt das Myxothiazolderivat, bei dem sich die Doppelbindungen in der für Polyketide üblichen ("regulären") Lage befinden. Grau hervorgehoben ist die Dienteilstruktur.

#### 3.14.1 Spezifische Inaktivierung von *mtaH* durch einfache homologe Rekombination

Um den möglichen Einfluss von MtaH auf die Umlagerung der Doppelbindungen zu untersuchen, wurde das zugehörige Gen inaktiviert. Mit den Primern E3 und E4 wurde von Cosmid E201 ein 532 bp große PCR-Amplifikat erzeugt, welches in pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO kloniert wurde. Daraus resultierte Plasmid pESW26, das in *S. aurantiaca* DW4/3-1 elektroporiert wurde. Die ortsspezifische Integration von pESW26 wurde bei der erhaltenen Mutante ESW200 durch Southern Blot Analyse bestätigt.

Bei der sogenannten "regulären" Lage der Doppelbindungen stünden diese in Konjugation mit der Bisthiazoleinheit, was zu einer bathochromen Verschiebung eines der beiden Absorptionsmaxima führen könnte. In der DAD gekoppelten HPLC-Analyse des Extraktes der Mutante ESW200 war keine Veränderung im UV-Spektrum von Myxothiazol feststellbar.

Ob sich die Lage der Doppelbindungen geändert hat, kann sicher anhand eines  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde aus der Mutante ESW200 Myxothiazol isoliert und anschließend einer  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse unterzogen (Vorgehensweise wie bei (Trowitzsch *et al.*, 1980) beschrieben).

Eine Verschiebung der Doppelbindungen würde die chemische Verschiebung sowie das Aufspaltungsmuster insbesondere der Signale 7-H; 8-H, 10-H, 11-H, 12-H sowie 15-H<sub>3</sub> beeinflussen. Bei "irregulärer" Lage der Doppelbindungen (unverändertes Myxothiazol) befindet sich nur ein Proton an C-11, dem aufgrund der Kopplung mit zwei benachbarten Protonen (H-10 und H-12) das Dublett von Dublett (dd) bei 5.69 ppm zugeordnet werden kann. Des weiteren befindet sich in diesem Fall ein Proton an C-7, dessen Signal aufgrund der Kopplung mit H-8 sowie der Methylgruppe an C-7 (15-H<sub>3</sub>) zu einem Dublett von Quartett (dq) aufspaltet. Ist die Lage der Doppelbindungen jedoch "regulär", wäre an C-7 kein Proton mehr gebunden und das entsprechende dq bei 3.94 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum folglich nicht mehr zu beobachten. Außerdem würde sich das Aufspaltungsmuster von 8-H sowie der Methylprotonen 15-H<sub>3</sub> ändern, da sie ihren Kopplungspartner (H-7) verlieren würden. An C-11 hingegen wären bei "regulärer" Lage der Doppelbindungen anstelle eines Methinprotons nun zwei Methylenprotonen gebunden. Dies hätte neben der Verdopplung der Signalintensitäten auch eine Hochfeldverschiebung des Multipletts zur Folge, die aus der geänderten chemischen Umgebung der Protonen resultiert. Des weiteren würden sich die Aufspaltungsmuster der vicinalen Protonen 10-H und 12-H ändern, da sie nun mit zwei Protonen an C-11 koppeln würden.

Die Analyse des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der isolierten Substanz zeigte keine der erwarteten Veränderungen; das Spektrum ist identisch mit dem von Myxothiazol. Demnach hat keine Umlagerung der Doppelbindungen stattgefunden und bei der isolierten Substanz handelt es sich um unverändertes Myxothiazol.



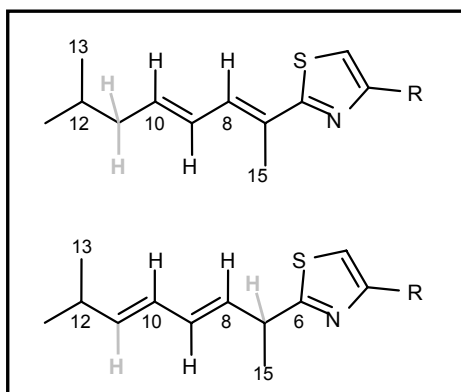


Abbildung 3.36 Die Nonadienylseitenkette mit "regulärer" und "irregulärer" Lage der Doppelbindungen im Vergleich. Die Protonen, an denen sich die beiden Isomere unterscheiden lassen, sind grau abgebildet.

### 3.14.2 Spezifische Inaktivierung von *mtaH* durch In-Frame Deletion

Allgemein sind „kleine“ Gene, wie z.B. *mtaH* mit einer Größe von 975 bp über eine einfache homologe Rekombination schwieriger zu Inaktivieren als große Gene (Vergleiche *mtaB* und *mtaD*). In den merodiploiden Mutanten liegt das betroffene Gen in zwei Kopien vor, die erste Kopie weist eine 5'-Deletion auf, während bei der zweiten Kopie das 3'-Ende des Gens deletiert ist (siehe Abbildung 3.37). Bei kleinen Genen steigt das Risiko, dass trotz der jeweiligen Deletion ein funktionsfähiges Protein gebildet wird. Um auszuschließen, dass in Mutante ESW200 trotz der Mutagenese ein funktionsfähiges Protein gebildet wird, sollte der mittlere Genabschnitt von *mtaH* (Nukleotide 333-665) unter Erhalt des Leserahmens wie in 2.15.4 beschrieben über eine zweifache homologe Rekombination deletiert werden.

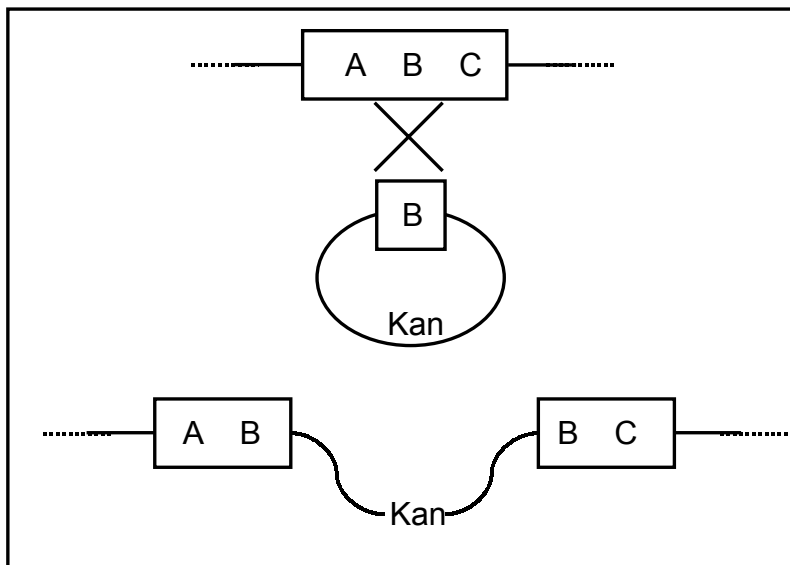


Abbildung 3.37 Abgebildet ist die Insertionsinaktivierung durch einfache homologe Rekombination. In der merodiploiden Mutante zeigt die erste Kopie des Gens (AB) eine Deletion am 3'-Ende. Die zweite Kopie des Gens (BC) zeichnet sich durch eine 5'-Deletion aus. In der Mutante ESW200 sind am 3'-Ende 387 bp deletiert. Am 5'-Ende umfasst beträgt die Deletion 56 bp. Außerdem befindet sich hier kein Promotor mehr vor dieser Kopie des Gens.

#### 3.14.2.1 Konstruktion des Mutageneseplasmids pESW64

Exemplarisch für die nach Strategie A (siehe Abbildung 3.15) konstruierten Plasmide wird hier die Klonierung von pESW64 detailliert beschrieben. Eine PCR wurde unter Verwendung der Primerpaare ISO1FOR/ISO2REV (erzeugt ein 618 bp großes PCR-Produkt) und ISO3FOR/ISO4REV (erzeugt ein 622 bp großes PCR-Produkt) mit *Pfu* DNA-Polymerase durchgeführt. Als Matrize diente das Cosmid E201. Vor der finalen Extension wurde den Ansätzen *Taq* DNA-Polymerase zugesetzt. Die PCR Amplifikate wurden gemäß Herstellerprotokoll in pCR®-2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert. Es resultierten die Plasmide pESW47 (enthält das 618 bp große PCR-Amplifikat) und pESW51 (enthält das 622 bp große PCR-Amplifikat). Die Klonierungen wurden durch Restriktionsanalyse und DNA Sequenzierung verifiziert. Das Insert aus pESW47 wurde durch Hydrolyse mit *PvuII* und *PstI* gewonnen, wohingegen das Insert aus pESW51 durch Restriktion mit *PstI* und *XbaI* ausgeschnitten wurde. In einer unidirektionellen Klonierung wurden beide Fragmente mit dem zuvor mit *SmaI* und *XbaI* restringierten Vektor pSWU41 (Wu & Kaiser, 1996) ligiert, woraus Plasmid pESW64 resultierte.

### 3.14.2.2 Konstruktion der *mtaH*Δ<sub>333-665</sub> Mutante

Nach der Transformation von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit pESW64 wurden die Kanamycin-resistenten Transformanten einem PCR Screening unterzogen. Dabei wurde die ortsspezifische Integration des Mutageneseplasmides in das Chromosom gezeigt. Aus der genotypisch korrekten Merodiploiden ESW435 wurde durch Passage ohne Kanamycin die Mutante ESW444 erzeugt, die nach der zweiten homologen Rekombination die geplante Veränderung im Genotyp zeigte.

### 3.14.2.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Da die merodiploiden Mutanten bei dieser Mutagenese über eine intakte Kopie von *mtaH* verfügen, wurde auf ihre phänotypische Analyse verzichtet. In der DAD gekoppelten HPLC-Analyse waren die nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Deletionsmutanten Myxothiazol-positiv. Es konnte wie schon bei der Inaktivierung durch einfache homologe Rekombination keine zusätzliche Substanz mit einer dem Myxothiazol ähnlichen UV-Spektrum identifiziert werden, was auf eine veränderte Lage der Doppelbindungen hingewiesen hätte. Auf die Durchführung einer <sup>1</sup>H-NMR-Analyse zur Bestätigung, dass es sich um unverändertes Myxothiazol handelt, wurde verzichtet.

## 3.15 Auffinden und Inaktivierung von *mtaX* (dem *mtaH*-Isogen)

In der Southern Blot Analyse zum Nachweis der zweiten homologen Rekombination wurden außer den erwarteten spezifischen Signalen zusätzlich schwächere Signale detektiert. Dieser Befund warf die Frage nach dem Vorhandensein eines Isogens von *mtaH* auf, welches möglicherweise die Funktion des inaktivierten *mtaH* komplementiert. Zur Vermeidung der denkbaren Komplementation, sollte das Isogen identifiziert und inaktiviert werden.

In der bis jetzt noch unvollständigen Genomsequenz von *Myxococcus xanthus* DK1622 (einzusehen unter der Internetadresse [www.tigr.org](http://www.tigr.org)), lässt sich ebenfalls ein ORF mit Homologien zu Heptadienisomerasen identifizieren. Das abgeleitete

Genprodukt ist zu 40 % identisch mit MtaH. Unter der Annahme, dass in *S. aurantiaca* DW4/3-1 ein homologes Gen vorhanden ist, wurden innerhalb dieses offenen Leserahmens von *M. xanthus* DK1622 zwei Primerpaare abgeleitet (siehe Abbildung 3.38).



Abbildung 3.38 Strategie zum Auffinden des Isogens von *mtaH*. Als Pfeil dargestellt ist der ORF von *Myxococcus xanthus*, dessen abgeleitetes Protein Ähnlichkeiten zu Heptadienisomerasen aufweist. Zusätzlich sind die innerhalb des ORFs abgeleiteten Primer eingezeichnet.

Mit chromosomaler DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 als Matrize und den vier möglichen Primerkombinationen wurde eine PCR durchgeführt. Das Primerpaar MXISO3/MXISO4 erzeugte ein spezifisches 458 bp großes PCR-Amplifikat. Aus der Klonierung des PCR-Produktes in pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO resultierte Plasmid pESW204. Die Sequenzierung der Insert-DNA zeigte, dass ein Abschnitt eines von *mtaH* verschiedenen HDI ähnlichen Gens amplifiziert wurde, welches als *mtaX* bezeichnet wurde. Das Genprodukt von *mtaX* zeigt zu MtaH eine Identität von 40 % und eine Ähnlichkeit von 51 %. Zu dem HDI ähnlichen Gen aus *M. xanthus* DK1622 ist *mtaX* auf DNA-Ebene zu 87 % identisch. Auf Protein-Ebene beträgt die Identität 89 % und die Ähnlichkeit 94 %.

Plasmid pESW204 wurde zur Geninaktivierung sowohl in den Wildtypen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 als auch in die Mutante ESW444 elektroporiert.

### 3.15.1 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Sowohl die aus dem Wildtypen resultierende Einfachmutante ESW462 als auch die von der Deletionsmutante abgeleitete Doppelmutante ESW463 waren in der DAD gekoppelten HPLC-Analyse Myxothiazol-positiv. Zusätzlich wurde aus dem Extrakt der Doppelmutanten Myxothiazol isoliert und einer <sup>1</sup>H-NMR-Analyse unterzogen. Wie schon bei der <sup>1</sup>H-NMR-Analyse des aus dem Extrakt von Mutante ESW200 isolierten

Myxothiazol konnte keine Veränderung im Vergleich zum Referenzspektrum festgestellt werden.

Tabelle 3.7 Die zur Charakterisierung der Myxothiazolbiosynthese durchgeführten Mutagenesen

Gen	Domäne	Inaktivierungs-plasmid	Mutante	erwartetes Myxothiazol-Derivat	Detektiert
<i>mtaB</i>	ER* im 1. Modul	pESW25	ESW321	Thiazolin-Thiazol Bisthiazolin reguläre Lage der Doppelbindungen	Null-Produzent
<i>mtaB</i>	KR im 1. Modul	pESW41	ESW414	10-Keto-Derivat	Null-Produzent
<i>mtaC</i>	Ox	pESW33	ESW400	Thiazolin-Thiazol	Myxothiazol
<i>mtaD</i>	Ox	pESW36	ESW392	Thiazol-Thiazolin	Null-Produzent
<i>mtaE</i>	OMT	pESW45	ESW409	18-Desmethyl	Null-Produzent
<i>mtaF</i>	OMT	pESW17	ERM4	20-Desmethyl	Null-Produzent
<i>mtaG</i>	MOX	pESW24	ESW331	Myxothiazol-Glycin- Addukt	Null-Produzent
<i>mtaH</i>		pESW26	ESW200	reguläre Lage der Doppelbindungen	Myxothiazol
<i>mtaH</i>		pESW64	ESW444	reguläre Lage der Doppelbindungen	Myxothiazol
<i>mtaX</i>		pESW204	ESW462	reguläre Lage der Doppelbindungen	Myxothiazol
<i>mtaH</i> und <i>mtaX</i>		pESW204 in ESW444	ESW463	reguläre Lage der Doppelbindungen	Myxothiazol

### 3.16 Suche nach dem Melithiazol-Biosynthesegencluster

Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit von Myxothiazol und Melithiazol (siehe Abbildung 1.9) wurde vermutet, dass die Sequenzen der für die Biogenese verantwortlichen Gene ähnlich sind. Die genomische DNA verschiedener Melithiazol-Produzenten wurde unter stringenten Bedingungen (Hybridisierungstemperatur 40°C; Durchführung des zweiten Waschschruttes mit 0,5 x SSC bei 60°C) mit Sonden aus *mtaE* und *mtaF* des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters hybridisiert (zur Durchführung siehe 2.14). Dabei zeigte lediglich *Melittagium lichenicola* Me l46 mit beiden Sonden deutliche Signale. Von diesem Organismus wurde wie unter 2.16 beschrieben eine Cosmidgenbank angelegt, welche einer Koloniehybridisierung mit der gemischten *mtaE/mtaF*-Sonde unterzogen wurde. Dabei konnte ein positiver Klon (Cosmid M1) identifiziert werden. Die vom Insert dieses Klons erhaltenen Endsequenzen (T3- und T7-Ende) wurden mit der *mta* Sequenz verglichen. So konnte gezeigt werden, dass Cosmid M1 ein Fragment trägt, das wahrscheinlich mit dem für die O-MT kodierenden Abschnitt von *melE* (dem zu *mtaE* analogen Gen) beginnt und die stromabwärts gelegenen Gene enthält (siehe Abbildung 3.39). Ausgehend von der Sequenz des T7-Endes wurde das Primerpaar MEL1 und MEL3L abgeleitet. Mit diesem wurde wie in 2.16 beschrieben ein PCR-Screening durchgeführt. Dabei konnte von Cosmid M2 das erwartete 350 bp PCR-Fragment amplifiziert werden. Der Vergleich der Endsequenzen des Inserts von Cosmid M2 mit dem *mta* Cluster zeigte, dass das Insert dieses Klons den für die AT kodierenden Bereich von *melF* (dem zu *mtaF* analogen Gen) einschließlich der stromaufwärts gelegenen Gene enthält (siehe Abbildung 3.39). Die Sequenz des Cosmides M1 wurde von der Fa. MWG ermittelt. Die DNA-Sequenzierung von Cosmid M2 erfolgte in der Abteilung Genomanalyse (GNA) der GBF.

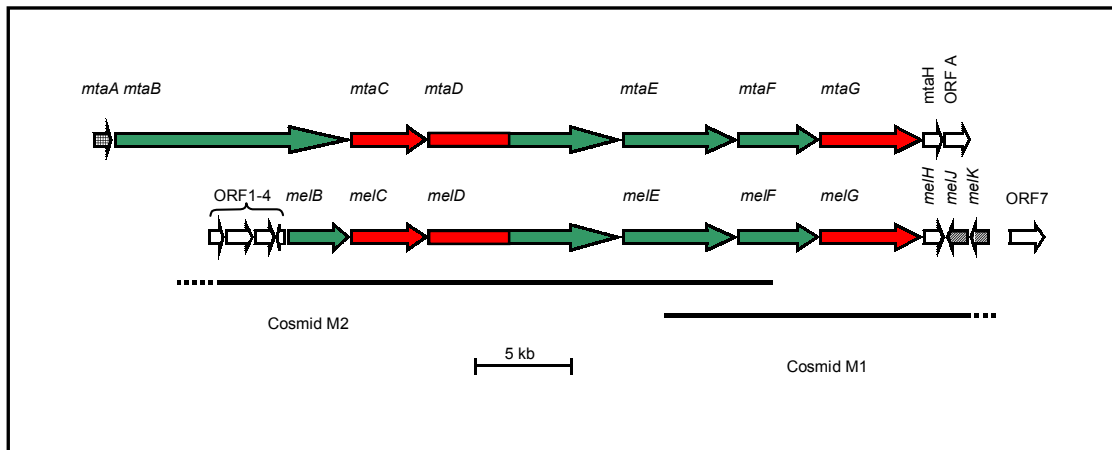


Abbildung 3.39 Die Genanordnung des *mta* und des *mel* Genclusters im Vergleich. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der Gene an. Der karierte Pfeil steht für *mtaA*, das für eine Phosphopantetheinyltransferase kodiert. PKS Module sind grün und NRPS Module rot dargestellt. Offene Leserahmen mit unbekannter Funktion sind weiß dargestellt. Schraffierte Pfeile stehen für Leserahmen, die dekorierende Enzyme kodieren.

### 3.17 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der beiden überlappenden Cosmide zeigte einen 42 kb umfassenden DNA-Abschnitt mit einem GC-Gehalt von 69,7 %, der 14 offene Leserahmen (ORFs) enthält. Bei der Festlegung der offenen Leserahmen wurde außer ATG auch GTG als mögliches Startcodon berücksichtigt.

7 dieser Leserahmen, die mit *melB* bis *melH* bezeichnet wurden, zeigen signifikante Ähnlichkeiten zu den *mta*-Genen aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 (vergleiche Tabelle 3.11). Diese sind wahrscheinlich für die Melithiazolbiosynthese in *M. lichenicola* Me 146 verantwortlich. Aufgrund der geringen Abstände zwischen den offenen Leserahmen und der gleichen Leserichtung wurde vermutet, dass die Gene *melB* bis *melH* ein Operon bilden.

#### 3.17.1 Analyse der *mel*-Gene

Dem ATG-Startcodon des mit *melB* bezeichneten Gens geht im Abstand von 4 bp eine potentielle RBS (5'-AGGG-3') voraus. Die Ähnlichkeiten zu den in Datenbanken hinterlegten Sequenzen weisen *MelB* als PKS aus. Zwischen dem Stopcodon von *melB* und dem Startcodon von *melC* befinden sich 32 bp. In diesem Bereich konnte keine potentielle RBS identifiziert werden. Die von *melC* abgeleitete Primärsequenz

zeigt im Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu NRPSs. *melC* und das stromabwärts gelegene *melD* scheinen wegen der Überlappung von Stop und Startcodon (GTGA, das Startcodon ist unterstrichen) translational gekoppelt zu sein. Die computergestützten Datenbankvergleiche zeigen, dass *MelD* ein NRPS und ein PKS Modul enthält. Zwischen den Genen *melD* und *melE* befindet sich ein Abschnitt von 52 bp. Für *melE* lässt sich 10 bp vor dessen ATG Startcodon eine potentielle RBS (5'-GAGAGG-3') identifizieren. Datenbankvergleiche mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *melE* zeigen Ähnlichkeiten zu PKS. Da das Stopcodon von *melE* mit dem Startcodon von *melF* überlappt (ATGA, das Startcodon ist unterstrichen), kann von einer translationalen Kopplung beider Gene ausgegangen werden. Der Vergleich mit Sequenzen in den Datenbanken zeigt, dass es sich bei *MelF* um eine PKS handelt. Innerhalb der Genabschnitte von *melD* und *melF*, die für die AT Domänen (siehe nächsten Abschnitt) kodieren, wurden zwei direkte Sequenzwiederholungen mit einer Identität von 99,1 % auf einer Länge von 1222 bp identifiziert. *melF* und das stromabwärts liegende *melG* scheinen ebenfalls translational gekoppelt zu sein. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten handelt es sich bei *MelG* um eine NRPS. 18 bp hinter dem Stopcodon von *melG* liegt das ATG Startcodon von *melH*. 8 bp stromaufwärts befindet sich vor diesem eine potentielle RBS (5'-GGAGGAGG-3'). Im computergestützten Datenbankvergleich zeigt *MelH* Ähnlichkeiten zu Heptadienisomerasen (siehe Tabelle 3.9).



### 3.18 Analyse der stromaufwärts des *mel* Clusters gelegenen offenen Leserahmen

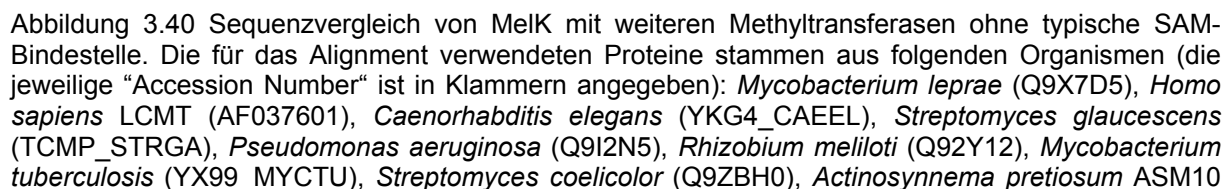
Stromaufwärts von *melB* befindet sich ORF4, der in entgegengesetzter Richtung wie die Gene des *mel* Clusters transkribiert wird und Ähnlichkeiten zu dem aus *E. coli* stammenden Glutaredoxin GRX3 zeigt (45 % Identität und 65 % Ähnlichkeit auf Proteinebene; siehe Tabelle 3.9). Die von ORF4 abgeleitete Aminosäuresequenz ist außerdem ähnlich zu GrxC aus *Yerinia pestis* (45 % Identität und 59 % Ähnlichkeit auf Proteinebene). Sequenzhomologien zu Zuckerepimerasen zeigt ORF3, der in die gleiche Richtung wie die Gene des *mel* Clusters transkribiert wird. Zu dem aus *E. coli* stammenden WbnF beträgt die Identität 48 % und die Ähnlichkeit 64 %. Die von ORF2 abgeleitete Proteinsequenz zeigt hohe Ähnlichkeiten zu (Aminosäure-)oxidasen, wie CrtL aus *Crotalus adamanteus* (51 % Identität und 70 % Ähnlichkeit auf Proteinebene). Dieser ORF könnte für die Dehydrierung der Isopropylseitenkette des Melithiazols verantwortlich sein. ORF1 ähnelt einer aus *Archaeoglobus fulgibus* stammenden Glycosyltransferase (51 % Identität und 70 % Ähnlichkeit auf Proteinebene). Ob diese ORFs eine Funktion in der Melithiazolbiosynthese besitzen, ist unklar. In Tabelle 3.9 sind weitere Proteine aufgelistet, die den von den ORFs 1 bis 4 abgeleiteten Aminosäuresequenzen ähneln.

### 3.19 Analyse der stromabwärts des *mel* Clusters gelegenen offenen Leserahmen

Am 3'-Ende des Genclusters befinden sich die translational gekoppelten Gene *melK* und *melJ*, die in entgegengesetzter Richtung wie die Gene *melB* bis *melH* transkribiert werden.

Bei der Datenbanksuche mit Hilfe des BLAST-Algorithmus zeigte MelK Ähnlichkeiten zu zahlreichen, nicht charakterisierten Proteinen. Es wurden aber auch Ähnlichkeiten zu Asm10, einer N-Methyltransferase aus der Ansamitocinbiosynthese in *Actinosynnema pretiosum* (Yu *et al.*, 2002), und zu der aus dem Schweinehirn isolierten, SAM-abhängigen Phosphatase-2A-Leucin-Carboxyl-Methyltransferase

(LCMT; (De Baere *et al.*, 1999)) gefunden. Die für SAM-abhängige Methyltransferasen beschriebenen vier Motive der Cofaktorbindestelle (Kagan & Clarke, 1994) konnten in den gefundenen Proteinen jedoch nicht identifiziert werden. Erst ein von Hans Jürgen Hecht durchgeführtes „profile fitting alignment“ der MelK ähnlichen Sequenzen mit der Struktur des aus *Pyrococcus furiosus* stammenden Protein-L-Isoaspartat-O-Methyltransferase (Pimt; Proteindatenbankidentifikationsnummer 1JG4) und weiteren Vertretern der Pimt-Familie ließ die Motive der SAM-Bindestelle erkennen. Bei dem in Abbildung 3.40 dargestellten Sequenzvergleich zwischen den zu MelK ähnlichen Proteinen und typischen Pimt-Methyltransferasen sind die von (Kagan & Clarke, 1994) definierten Motive durch rote (Motiv I), grüne (Motiv post I), gelbe (Motiv II) und blaue Dreiecke (Motiv III) markiert. Die vier schwarzen Dreiecke kennzeichnen die Aminosäuren, die in 1JG4 über ihre Seitenketten direkt mit SAM wechselwirken. Zwei dieser vier Reste sind in manchen Sequenzen konservativ substituiert (Glycin durch Alanin in Position 108 und Glutamat durch Aspartat in Position 128), die beiden übrigen sind nicht konserviert, was sich mit den Beobachtungen von Martin und McMillan deckt (Martin & McMillan, 2002). Das in allen Sequenzen enthaltene Glycin befindet sich in einer Position, in der jede Seitenkette störend auf das Schwefelatom des Cofaktors wirken würde. Es muss davon ausgegangen werden, dass MelK (ebenso wie Asm10 und LCMT) SAM ähnlich bindet wie die Methyltransferasen, die eine typische Cofaktorbindestelle enthalten.



(AF453501), *Streptomyces coelicolor* (Q9FBX1), *Anabaena* sp. (Q8YKG6), *Methanosarcina acetivorans* (Q8TLW9), *Methanosarcina mazei* (Q8PWV7), *Mycobacterium tuberculosis* (Q33293), *Oceanobacillus iheyensis* (BAC13195), *Bacillus subtilis* (Q45500), *Arabidopsis thaliana* (Q93YR1), *Oryza sativa* (AAN65019), *Rhizobium loti* (Q98LR1), *Pseudomonas aeruginosa* (Q9HX18), *Archaeoglobus fulgibus* (PIM1\_ARCFU), *Methanococcus jannaschii* (PIMT\_METJA), *Pyrococcus horikoshii* (PIMT\_PYRHO), *Aeropyrum pernix* (PIMT\_AERPE), *Pyrococcus furiosus* (Die Proteindatenbankidentifikationsnummer der PIMT ist 1JG4). Die magentafarbenen Rechtecke markieren hydrophobe Bereiche, die in Kontakt mit dem Cofaktor treten. Bereiche mit  $\beta$ -Faltblattstruktur sind mit schwarzen Pfeilen,  $\alpha$ -helicale Abschnitte mit Schlangenlinien markiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

MelJ gehört in die Nitrilase Superfamilie, die auch Amidasen einschließt. Für diese Proteinfamilie wurde eine aus den Aminosäuren Glutamat, Lysin und Cystein bestehende katalytische Triade beschrieben, die Säureamide zu freien Säuren hydrolysiert (Pace & Brenner, 2001). Die hochkonservierten Aminosäuren dieser katalytischen Triade konnten in MelJ identifiziert werden.

MelJ	42	L	PEFY	46	110	V	RKRRAP	116	143	G	CADNHFG	151
NIT3	63	F	PEAF	67	150	H	RKVMPT	156	184	A	CWENRMP	192
CHY1	44	F	PEVW	48	121	A	RHQPP	127	162	L	NCWENMNP	170
CHT	44	F	PEVW	48	126	R	RKIKPT	132	161	L	NCWENMNP	169
BXN	43	F	PELW	47	125	R	RKLKPT	131	159	L	NCALNLQS	167
ORF NC003028	41	L	PELF	45	114	Y	RKTHIP	120	151	G	CWDQWEP	159

Abbildung 3.41 Die katalytische Triade von MelJ. Die Aminosäuren, welche die katalytische Triade bilden (Pace & Brenner, 2001), sind grau unterlegt. Gelb unterlegte Aminosäuren sind in allen sechs Proteinen identisch. Aminosäuren, die in mindestens drei Proteinen vorkommen, sind rot unterlegt. Die verglichenen Aminosäuresequenzen stammen aus den folgenden Organismen: *Arabidopsis thaliana* (NIT3), *Fusarium lateritium* (CHY1), *Gloeocercospora sorghi* (CHT), *Klebsiella pneumoniae* (BXN) und *Streptococcus pneumoniae* (ORF NC003028).

Aufgrund der identischen Anordnung der Gene *melB-melG* bzw. *mtaB-mtaG* wurde vermutet, dass im Verlauf der Melithiazolbiosynthese zunächst ein Säureamidintermediat entsteht. MelJ und MelK könnten für die Umwandlung dieser Zwischenstufe in den Methylester verantwortlich sein.

Das Ende des Genclusters stellt vermutlich ORF7 da, der Ähnlichkeiten zu ABC-Transportern aufweist und möglicherweise für die Resistenz des Produzentenorganismus gegen Melithiazol nötig ist.

Tabelle 3.8 Die abgeleiteten Funktionen der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten Gene.

Gen	Größe in bp; GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position; Größe des abgeleiteten Proteins	Domänen (und ihre Position in der Proteinsequenz)	Position in der Nukleotidsequenz
<i>melB</i>	3 153 bp (72,0/52,5/91,3) 111 621 Da	PKS KS (16-443) AT (555-870) ACP (962-1028)	13925-15208 15542-16489 16763-16963
<i>melC</i>	3 972 bp (72,4/465,5/90,7) 146 206 Da	NRPS HC (52-452) A (538-1001) PCP (1025-1093) Ox (1025-1093)	17218-18420 18676-20070 20137-20343 20347-21036
<i>melD</i>	9 855 bp (72,1/47,3/91,0) 357 430 Da	NRPS, PKS HC (74-473) A (560-1291) Ox (989-1241) PCP (1319-1383) KS (1447-1874) AT (1981-2296) DH (2307-2521) S (2612-2849) KR (2882-3143) ACP (3157-3226)	21252-22451 22710-24905 24000-24755 24987-25181 25371-26654 26973-27920 27951-28595 28866-29579 29676-30459 30501-30710
<i>melE</i>	5 739 bp (71,0/49,4/90,9) 206 932 Da	PKS KS (35-429) AT (573-890) OMT (972-1246) S (1252-1454) KR (1486-1746) ACP (1783-1849)	31042-32328 32656-33609 33853-34677 34693-35301 35395-36177 36286-36486
<i>melF</i>	4 083 bp (67,8/44,0/92,3) 148 434 Da	PKS KS (39-464) AT (571-886) OMT (946-1221) ACP (1272-1338)	36789-38066 38385-39332 39510-40337 40488-40688
<i>melG</i>	5 247 bp (71,6/45,3/89,8) 192469 Da	NRPS C (68-518) A (555-1380) MOX (753-1114) PCP (1401-1469) TE (1488-1748)	40955-42305 42416-44893 43010-44095 44954-45160 45215-46000

Tabelle 3.9 Die abgeleiteten Funktionen der in Abbildung 3.39 dargestellten offenen Leserahmen.

Gen bzw. Protein	Größe in bp; GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position; Größe des abgeleiteten Proteins	Sequenzähnlichkeit zu (Herkunft und zusätzliche Information)	Ähnlichkeit/ Identität	Accession Number	angenommene Funktion
ORF1	699 bp 74,5/59,5/91,4 24 529 Da	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Desu6317	44 % / 33 %	NZ_AABB0100 2778.1	Hypothetisches Protein
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	40 % / 28 %	C69298	ähnlich zu Glycosyltransferasen
		<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB1411	40 % / 26 %	F75058	Dolichol-p-Glucosesynthetase
ORF2	1 359 bp 79,0/55,8/88,5 48 004 Da	<i>Crotalus adamanteus</i> CrtI	70 % / 51 %	JE0266	L-Aminosäure-Oxidase
		<i>Mycobacterium aurum</i>	66 % / 54 %	CAB94794	Phytoene Dehydrogenase
		<i>Lyngbya majuscula</i> BarJ	37 % / 23 %	AF516145	oxidative Desaminierung von Trichloroleucin
ORF3	963 bp 68,4/48,2/92,2 35 377 Da	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pflu2613	67 % / 50 %	ZP_00085359	Hypothetisches Protein
		<i>Escherichia coli</i> WbnF	64 % / 48 %	AAD50494	Nucleotid-Zucker-Epimerase
		<i>Thermosynechococcus elongatus</i> ORF_ID:tlI1200	62 % / 49 %	NP_681990	Nucleotid-Zucker-Epimerase
ORF4	282 bp 62,4/41,9/80,7 10 290 Da	<i>Escherichia coli</i>	65 % / 45 %	P37687	Glutaredoxin
		<i>Yersinia pestis</i> GrxC	59 % / 45 %	NP_403730	Glutaredoxin
		<i>Rhodospirillum rubrum</i> Rrub2970	56 % / 44 %	ZP_00015942	Hypothetisches Protein
MelH	990 bp 66,3/43,1/90,0 36 189 Da	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> MTH1507	56 % / 40 %	A69068	2-Hydroxy-2,4-heptadien-1,7-disäure-Isomerase
		<i>Bacillus anthracis</i> BA_1697	56 % / 37 %	NP_655057	Fumarylacetoacetat-Hydrolase
		<i>Methanococcus jannaschii</i> MJ1656	56 % / 32 %	NP_248666	2-Hydroxy-2,4-heptadien-1,7-disäure-Isomerase

Gen bzw. Protein	Größe in bp; GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position; Größe des abgeleiteten Proteins	Sequenzähnlichkeit zu (Herkunft und zusätzliche Information)	Ähnlichkeit/ Identität	Accession Number	angenommene Funktion
MelJ	1 088 bp 67,4/50,5/91,9 37 051 Da	<i>Arabidopsis thaliana</i> NIT3	39 % / 26 %	P46010	Nitrilase
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> BXN	39 % / 26 %	P10045	Nitrilase
		<i>Fusarium lateritium</i> CHY1	39 % / 25 %	P32963	Formamid-Hydrolyase
MelK	906 bp 62,8/46,2/89,7 33 612 bp	<i>Methanosarcina acetivorans</i> MA2468	56 % / 39 %	NP_617374	Konserviertes hypothetisches Protein
		<i>Bacillus subtilis</i> YktD	52 % / 34 %	NC_000964.1	Konserviertes hypothetisches Protein
		<i>Actinosynnema pretiosum</i> Asm10	41 % / 28 %	AF453501.1	Methyltransferase
ORF7	1 788 bp 71,4/44,9/91,8 64 332 Da	<i>Nostoc punctiforme</i> Npun4209	61 % / 44 %	ZP_00109759	ABC-Transporter
		<i>Streptomyces avermitilis</i> ORF AB070945.1	52 % / 34 %	BAB69246	ABC-Transporter
		<i>Bacillus halodurans</i> BH1125	55 % / 36 %	E83790	ABC-Transporter

### 3.20 Analyse der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten Domänen

In Analogie zur MTAS (siehe 3.5) wurde die Melithiazolsynthetase (MELS) im Hinblick auf hochkonservierte Motive analysiert.

#### 3.20.1 Analyse der $\beta$ -Ketoacylsynthase Domänen

Typische Lademodule bakterieller Polyketidsynthasen des Typ I sind aus einer AT und einer ACP Domäne aufgebaut (Donadio *et al.*, 1991). Am N-terminalen Ende von MelB befindet sich jedoch eine KS Domäne, welche im Hinblick auf die Struktur des Melithiazols überflüssig erscheint. Aus dem Sequenzvergleich der MelB KS mit den übrigen drei KS Domänen der MELS ergibt sich kein Hinweis auf die mögliche Inaktivität. Sowohl das hochkonservierte Cystein (Donadio *et al.*, 1991) als auch die

Konsensus		DxxCSSxL
	Pos 160	
MelB	KS	GSGGVLS----MAAGRIAATLGLEGPALVVDTS <del>CS</del> SSSLVATHLACQSL
MelD	KS	DLQTLIGNDKDYLA <del>TH</del> LSYRLGLKGPSLSVQ <del>TAC</del> STSLV <del>AI</del> HLASQAL
MelE	KS	ALGTDPS----FLVGRISYLLGAQGPSVAVNTACSSSLVSVHLACQSL
MelF	KS	LTGTL <del>LT</del> ----FATGR <del>LS</del> HFLDLQGPSLAVDTACSSSLVAVHLACQSL

Konsensus		FAS	KAS	II	H	D	E	K	H
	Pos	309							
MelB	KS	GQGGIAPHEVGYVEA	HGAGSLLA	DSV	E	VKALAAVLGRQRAASAPVIGISV	KTNLGH	LEGA	
MelD	KS	AAANVEPSSLGYIETH	HGTGTPLGD	QI	E	LSALQQVFGASTDAVGVCPIGSV	KTNIGH	LEAA	
MelE	KS	ANAGVEPSQVSYIEA	HGTATPLGD	PI	E	VRALQRVFEPGRSRAQPLTLGSV	KTNLGH	LEAA	
MelF	KS	DNAGLQPEQVDYVEA	HGTGTALGD	PI	E	MRAIGAVFGPTREKSRLRVGSV	KTNIGH	LEFA	

### 3.20.2 Analyse der Acyltransferase Domänen

Das von Leadlay und Mitarbeitern definierte Konsensusmotiv GxSxG ist in den drei AT Domänen der MELS vorhanden (Haydock *et al.*, 1995). Mit Hilfe der von Hecht und Kendrew gefundenen HAFH Motives (siehe 3.5.2) lassen sich die beiden Malonyl-CoA-spezifischen AT Domänen von MelD und MelF identifizieren. Wie bereits bei der Analyse der AT Domäne von MtaE beobachtet, ist auch in der AT Domäne von MelE innerhalb des YASH Motives das Tyrosin durch ein Valin ersetzt.



Konsensus	GxSxG
Pos	613
MelB AT	QPAHVALQMGLAALLRSWGIVPDAIVGSSIGEVSSAYTAGVLSLEDA-MLVTHAS- 65 AS-
MelD AT	QPALFAVEYALAKVWMGWGKPGAVLGHSLGEYVAACVAGVMSLEEGLELVAKRG- 65 AS-
MelF AT	QPALFAVEYALAKVWMGWGKPGAVLGHSLGEYVAACVAEVMSLEEGLELVAKRG- 65 AS-
MelE AT	QPTLFAIAVALAAHWSWGIEPDVVGHSMEVAAAYVAGVLSLDDAARVICRRS- 65 AS-
Pos	732
MelB AT	SARQMGI <b>RYASH</b> SPAVEPRRPAMRRALGSLRLNAPTVPPLYTTVTGERAKPGD-FDAEHWT
M-CoA	HAFH
MelD AT	ESRELKTT <b>HAFH</b> SPLMEPMLEEYGKVLGKVKWGRPSVELVGNVSGRPVKGEEVSQGEYWK
MelF AT	ESRELKTT <b>HAFH</b> SPLMEPMLEEYGKVLGKVKWGRPSVELVGNVSGRPVKGEEVSQGEYWK
MM-CoA	YASH
MelE AT	FCRDVKVD <b>VASH</b> SPQVEPLLAELREQLLEGLRPEAARLTVYSTVTGSQTDGKD-WDASYWV

Abbildung 3.43 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten AT Domänen. Aminosäuren, die mit dem hochkonservierten Motiv funktionaler AT Domänen (Haydock *et al.*, 1995) übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die Sequenzabschnitte, die eine Unterscheidung in Malonyl-CoA (M-CoA) und Methylmalonyl-CoA (MM-CoA) spezifische AT Domänen ermöglichen, sind schwarz unterlegt. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.20.3 Analyse der $\beta$ -Ketoreduktase Domänen

Die in der Literatur beschriebenen konservierten Motive wurden in den beiden KR Domänen der MELS identifiziert (Scrutton *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1998).

		A
		S T
Konsensus	GxGxxGxxxA	LxGRxG
Pos	2882	
MelD KR	GAYLITGGLGGLGLQVARWMVERGARHLVLMGRKEPGEAAKESLRA	
MelE KR	GAYLITGGLGALGLQVSRWLVS KGARHLILASRSGLPDPGQWGS LP	

Abbildung 3.44 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten KR Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche die beiden Konsensusmotive enthalten. Die Aminosäuren, die mit den hochkonservierten Motiven funktionaler KR Domänen übereinstimmen, sind grau unterlegt (Scrutton *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1998). Sind innerhalb der hochkonservierten Motive verschiedene Aminosäuren möglich, wurden diese untereinander stehend aufgelistet. Angegeben ist die Position des ersten Proteins.

### 3.20.4 Analyse der $\beta$ -Hydroxy-Dehydratase Domäne

Lediglich im PKS-Modul von MelD ist eine DH Domäne vorhanden. Diese stimmt mit dem in der Literatur definierten Konsensusmotiv überein (Bevitt *et al.*, 1992; Donadio & Katz, 1992).

```

Konsensus          LxxHxxxGxxxxP
Pos 2356
MelD DH  FECTVSTGLFPFLADHGVHGATVLPSTVYMEVVRAAARELLGEGAHAEDEVLIQEVVLVRDDAE

```

Abbildung 3.45 Analyse der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten DH Domäne. Abgebildet ist der Proteinabschnitt, welcher das hochkonservierte Motiv funktionaler DH Domänen enthält. Aminosäuren, die mit diesem übereinstimmen, sind grau unterlegt (Bevitt *et al.*, 1992; Donadio & Katz, 1992). Die Nummerierung bezieht sich auf MelD.

### 3.20.5 Analyse der vermuteten O-Methyltransferase Domänen

Ebenso wie in MtaE und MtaF wurden auch innerhalb der PKS Domänen von MeIE und MeIF Proteinabschnitte mit Ähnlichkeiten zu SAM-abhängigen Methyltransferasen gefunden. In diesen neuartigen Domänen wurden die für SAM-Bindestellen typischen Motive identifiziert (Kagan & Clarke, 1994).

```

Motiv I              Motiv Post I
L                      E
IVEV C P              hhXhD
Konsensus             VLDIGGGTG
Pos 1013
MeIE OMT  FGGVRWESVRKVLDGCGYASDLLSLARRHPHLKLHGYTISAEQAAVDARRVRERGFEDR
MeIF OMT  YRGVDFSTRTRVLDIGCGHAADLVDLARAHPHLELHGCNISPDQIEVGRQIRALGLDGR

Motiv II              Motiv III
A Y L                  L I
GTY VIV                 K IIFL
Konsensus              PQFDAIFC                LLRPGGRLLI
Pos 1073
MeIE OMT  IRVFARDSAKDAFPDRYDVAFGFEVATHIADKDALFSNLARSLNNGGFLLLADFIAAGVS
MeIF OMT  VLLHYQDSSRDQFPSTYDLVIAYQVIHHIRAKSDFANISRSMPGGLLIMAETMSNMVS

```

Abbildung 3.46 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten O-Methyltransferase Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche die konservierten Motive SAM-abhängiger Methyltransferasen enthalten (Kagan & Clarke, 1994). Aminosäuren, die mit diesem übereinstimmen, sind grau unterlegt. Sind innerhalb der beschriebenen Motive verschiedene Aminosäuren möglich, wurden diese untereinander stehend aufgelistet. "h" steht für hydrophobe Aminosäure. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.20.6 Analyse der Acyl Carrier Protein und Peptidyl Carrier Protein Domänen

Entsprechend der Anzahl von PKS und NRPS Modulen enthält die MELS insgesamt vier ACP Domänen und drei PCP Domänen. In diesen wurden die hochkonservierten Motive funktionaler Carrier Protein Domänen mit guter Übereinstimmung identifiziert (Konz & Marahiel, 1999; Tang *et al.*, 1998).

ACPs				PCPs			
Konsensus		LGFD	S	Konsensus		DxFFxxLG	HSL
Pos	979			Pos	1045		
MelB ACP	SDWSLPLVRF	GFDS	LMGMKIKARIE	MelC PCP	PQDNLRQL	GASS	VELIKLASLLEQ
MelD ACP	LAGNDRFLFD	AGMDSL	MAIELRGRFQ	MelD PCP	VHLNFFDL	GGTS	SVHVVIHRKLRE
MelE ACP	LAPHQGFFQ	MGMNSL	MSVELKNHLE	MelG PCP	VTRGFFQ	MGGHSL	LAVRMMSSLRA
MelF ACP	LDLSQPLHTL	GMDSL	LLTMELKHKIH				

Abbildung 3.47 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten ACP und PCP Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte, welche die in der Literatur beschriebenen Konsensusmotive dieser Domärentypen enthalten (Konz & Marahiel, 1999; Tang *et al.*, 1998). Aminosäuren, die mit dem Konsensusmotiv übereinstimmen, sind grau unterlegt. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.20.7 Analyse der Kondensationsdomäne

Von den NRPS Modulen der MELS enthält lediglich MelG eine C Domäne. Die hochkonservierten Motive C1 bis C6 (Konz & Marahiel, 1999) wurden mit guter Übereinstimmung gefunden. Nur zwischen dem Konsensusmotiv C7 und MelG ist die Übereinstimmung gering.

Motiv	C1	C2	C3	C4
Konsensus	MY		V	F
Pos	68	114	192	232
	SRGQALWFV	RHGALRTTF	IHHIVYDGWS	YVDFVRW

Motiv	C5	C6	C7
Konsensus	I Q	N V	
Pos	347	383	399
	VGNEFMNI	HQDFPFH	RHSNSTPI

Abbildung 3.48 Analyse der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten C Domäne. MelG ist nur in den Bereichen der hochkonservierten Konsensusmotive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999). Aminosäuren, die mit diesen übereinstimmen, sind grau unterlegt. Angegeben ist die jeweilige Position von MtaG.

### 3.20.8 Analyse der Adenylierungsdomänen

In der MELS sind drei A Domänen enthalten. Wie bereits bei der Analyse der an der Myxothiazolbiosynthese beteiligten A Domänen festgestellt wurde, sind auch in diesen die Aminosäuren des Motives A2 (Konz & Marahiel, 1999) teilweise um eine Position versetzt (siehe Abbildung 3.49). Im Gegensatz dazu werden die übrigen Konsensusmotive mit guter Übereinstimmung innerhalb der analysierten Sequenzen wiedergefunden.

Motiv	A1	A2	A3	A4
	S	L I	T	
Konsensus	LTyxEL	LKAGxAyLVPLD	LAYxxYTSGSTGxPKG	FDxS
Pos	538	581	652	702
MelC A	LSYAQLR	AIQLAGAAYLPVDP	DLAYCIYTSGSTGRPKG	GFDLSV
MelD A	LTyAELE	AILRAGAAYLPLDP	SLAYVIYTSGSTGRPKG	SFDLSV
MelG A	LSYQELN	GILKAGGAYVPMDP	NVAYTIYTSGSTGRPKG	SFDISV

Motiv	A5	A6	A7
		L	K
Konsensus	NxYGPTE	GELxIxGxGVARGYL	YRTGDL
Pos	800	853	888
MelC A	ISLGGATEG	PGELFIGGVGVARGYFR	LYRTGDLG
MelD A	VSLGGATEA	TGQLYIGGIGLSLGYR	LYATGDLG
MelG A	LNMYGPTET	PGELLIGGEGVTRGYLD	LYRTGDLA

Motiv	A8	A9	A10
		V	L
Konsensus	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	LPxYMIP	NGKVDR
Pos	906	976	996
MelC A	LGRKDFQVKVAGHRIELGEIEA	TLPQYMPVG	SNGKVDR
MelD A	LGREDFQVKIQGYRIELGEIEA	KLPAYMVPS	ANGKVDR
MelG A	LGRLDHQVKVRGVRIELGEIEA	KLPAAMIPS	PNKKLDV

Abbildung 3.49 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten A Domänen. Die A Domänen sind nur in den Bereichen der hochkonservierten Konsensusmotive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999). Grau unterlegt sind die Aminosäuren, welche mit den Konsensusmotiven übereinstimmen. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

Die Anwendung des Spezifitätscodes für A Domänen (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999) auf die MELS ist in Tabelle 3.10 dargestellt. Die A Domänen von MelC und MelD nutzten offensichtlich Cystein als Substrat. Der A Domäne von MelG dient wahrscheinlich Glycin als Substrat.

Tabelle 3.10 Die spezifitätsbestimmenden Aminosäuren der A Domänen der MELs. Die Nummerierung bezieht sich auf die Phenylalanin-spezifische A Domäne der Gramicidinsynthetase (Conti *et al.*, 1997).

Position		235	236	239	278	299	301	322	330
Consensus Cystein		D	LH	YFE	NS	LMD	SIV	MLG	I
MelC		D	L	Y	N	M	S	L	V
MelD		D	L	Y	N	L	S	L	I
Consensus Glycin		D	LI	FLQ	NQM	NLF	AGV	LA	TIM
MelG		D	I	L	Q	L	G	M	I

### 3.20.9 Analyse der Heterozyklisierungsdomänen

MelC und MelD enthalten HC Domänen. Durch Datenbankvergleiche wurden in diesen die zugehörigen Konsensusmotive (Konz & Marahiel, 1999) identifiziert. Lediglich innerhalb des Motives Z2 zeigen MelC und MelD leichte Abweichungen.

Motiv	Z1	Z2	C3	Z3
	S	L M A D	R N	L F I A P
Konsensus	FPLTxxQxAYxxGR	RHxILPxNGxQ	DxxxxDxxS	LPxxPxLP
Pos	55	110	186	250
MelC HC	PFPLTDIQQAYLIGRG	LRSVVLPSGEQRV	IDIMTADASAV	DLPPAPVLPL
MelD HC	PFALTDIQNAYWVGRQ	LRMVVLASGQQVV	LDLLVADAFSF	TMAGPPFELPL

Motiv	Z4	Z5	Z6	Z7
	F T SA A V	N AQ	V A	I H F Y
Konsensus	TPxxxLxxxxxxILxxW	GDFT	PIVFTSxL	QVxLDxQxxxxxxxxxxWD
Pos	295	338	396	431
MelC HC	LTRAGVLCFAFSVDVLAANG	VGDFTS	MPVVFSTMLG	PQVWLDCQLRDDDGAALLFSWDY
MelD HC	VTPSMALCAAYGEVLRHG	IGDFTS	MPYVFSTSLVS	PQVWLDYQVFELNDELYFSWDY

Abbildung 3.50 Sequenzvergleich der an der Melithiazolbiosynthese beteiligten HC Domänen. Die HC Domänen sind nur in den Bereichen der hochkonservierten Konsensusmotive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999). Grau unterlegt sind die Aminosäuren, welche mit den Konsensusmotiven übereinstimmen. Angegeben ist die jeweilige Position des ersten Proteins.

### 3.20.10 Analyse der potentiellen Oxidationsdomänen

Obwohl die von *M. lichenicola* Me l46 produzierten Melithiazole durch ein Thiazolin-Thiazol-Heterozyklensystem charakterisiert sind, enthält MelC am C-terminalen Ende eine potentielle Ox Domäne.

Motiv	Ox-1
Konsensus	YxSAGxxYxVQxYx
Pos	1151
MelC Ox	DAKTLGRLVSNLRPLELDGKR--KYQYGSAAAGAYGVRLYLHVASGRVRGLDGGTYCHDPV
MelD Ox	TVSRLGDMLGCLMQLSLDDFLQPKYRYPSPVGGLYPVQAYLHLKPGAVEGLVGTTYHHPK
Motiv	Ox-2
Konsensus	EAG
Pos	1209
MelC Ox	RHALVRLSDTGALDMLHAKGNRALAASAAFSFFFVCDRRVLAPIHGKWRDYALLEAG
MelD Ox	RHELVLTPDVTLDRGLYVAGNRSIFDACGFSFLVAQMSAITPLYGEYARDFCMLEAG
Konsensus	xMxQLLxxxAxxxxxGxC
Pos	1268
MelC Ox	LMAQLLEMRA SDLDLGLCQVEAPRAEELRGVFQWEEHETLLHALVGGGLEWEEGSL
MelD Ox	YMAQLLMSSAPESQLGLCPVGGLNFEPLRQAFLLDEQHVLLHSFLGGGVDPASLA

Abbildung 3.51 Sequenzvergleich der potentiellen Oxidationsdomänen der MELS. Es sind nur die Proteinabschnitte abgebildet, welche die Konsensusmotive enthalten (Du *et al.*, 2000). Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit diesen überein. Angegeben ist die Position des ersten Proteins.

### 3.20.11 Analyse der Monooxygenase Domäne von MelG

In Analogie zu MtaG (siehe 3.5.11) wurde auch in MelG eine Domäne mit Ähnlichkeiten zu F<sub>420</sub>-abhängigen Monooxygenasen und bakteriellen Luciferasen identifiziert.

Konsensus1	AExxGxDxxxxxxDH	TxxIxLGxxVxxPx
Pos	783	
LXA	LVKLGRISEECGFDTVWLLLEHHFTEF-GLLGNP--YVAA--AYLLGATKKLNVGTAAIVLP	
FdD	LVELGVAAEAHGMDSA-TVSDHFQWRH-QGGHASFSLSWMTAVGERTNRIILLGTSVLTPT	
MitH	LWREVEDADRLGFDYAFSVEHHCTPHESWMPSPAVFCTG--AAL--RTERIRVGPMGWVPP	
MelG MOX	LMEGARFADEHGFTAVWTPERHFHSFGGIYPNPSV--VS--AAIAATTRNLRIRAGSVVLP	
Konsensus2	xRxxPAxxAxATxxxLxxGRxxLGxGxG	
Pos	840	
LXA	TA-HPVRQLEDVNLLDQMSKGRFRFGICRG	
FdgD	FRYNPAVIGQAFATMGCLYPNRVFLGVGTG	
MitH	LR-HPLHLVEEVATLDQLLGGRLLEVGLASG	
MelG MOX	LH-SPIRVAEEWSIVDNLSGGRVDLSFASG	

Abbildung 3.52 Analyse der MOX Domäne von MelG. Es sind nur die Proteinabschnitte mit signifikanten Ähnlichkeiten abgebildet. Die Aminosäuren, die mit den Konsensusmotiven

übereinstimmen, sind grau unterlegt (Purwantini & Daniels, 1998). Die Nummerierung bezieht sich auf MelG. Die verglichenen Aminosäuresequenzen stammen aus den folgenden Organismen: *Photorhabdus luminescens* (LXA), *Mycobacterium leprae* (F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase (FGD)) und *Streptomyces lavendulae* (Mith).

### 3.20.12 Analyse der Thioesterase Domäne

Mit Hilfe des beschriebenen Konsensusmotives für funktionale TE Domänen (Konz & Marahiel, 1999) wurde am C-Terminus von MelG eine entsprechende Domäne identifiziert.

		Y	
Konsensus		GHSxG	
Pos	1549		
MelG TE	PAGPYRLGG	STG	GLLAQAMAR

Abbildung 3.53 Analyse der Thioesterase Domäne. Es ist nur der Abschnitt von MelG abgebildet, der das hochkonservierte Motiv funktionaler TE Domänen enthält (Konz & Marahiel, 1999). Aminosäuren, die mit dem Konsensusmotiv übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die Nummerierung bezieht sich auf MelG.

### 3.21 Versuche zur genetischen Manipulation von *M. lichenicola* Me I46

Um eindeutig zu beweisen, dass das Melithiazol-Biosynthesegencluster kloniert und sequenziert wurde, sollte ein Protokoll zur genetischen Manipulation von *M. lichenicola* Me I46 etabliert werden. Die Suche nach einem geeigneten Selektionsmarker zeigte, dass dieser Organismus gegen Kanamycin, Streptomycin, Apramycin, Hygromycin und Tetracyclin resistent ist. Lediglich Ampicillin konnte über einen Zeitraum von 14 Tagen das Wachstum vollständig unterdrücken. Aus diesem Grund wurde Ampicillin in den folgenden Transformationsversuchen als Selektionsmarker eingesetzt.

### 3.21.1 Transformation von *M. lichenicola* Me I46 durch Elektroporation

Zur Konstruktion eines Inaktivierungsplasmides wurde ein 2,1 kb große *EcoRI/BglII* Fragment aus Cosmid M2, das in *meIE* die AT Domäne kodiert, in den *EcoRI/BamHI* hydrolysierten pUC18 kloniert, woraus Plasmid pMSW1 resultierte.

Die Inaktivierung nach Elektroporation von pMSW1 gemäß dem für die Gattung *Stigmatella* etablierten Protokoll (siehe 2.15) war nicht erfolgreich. Die Transformation via Elektroporation setzt disperses Wachstum in einem klaren Medium voraus. *M. lichenicola* Me I46 konnte nur in trüben Medien (M7- und VY/2-Medium) unter Ausbildung von Zellaggregaten verlässlich kultiviert werden, weshalb die Plattierungseffizienz dieses Stammes und die Überlebensrate bei der Elektroporation durch Zellzählung nicht exakt bestimmt werden konnten.

### 3.21.2 Transformation von *M. lichenicola* Me I46 durch Konjugation

Zur Konstruktion eines Inaktivierungsplasmides wurde Plasmid pMSW1 mit *EcoRI* und *XbaI* hydrolysiert. Das erhaltene 2,1 kb DNA-Fragment wurde in den gleichermaßen hydrolysierten pKC1132 (Bierman *et al.*, 1992) kloniert, woraus Plasmid pESW224 resultierte. Der Vektor pKC1132 zählt zu den konjugativen Plasmiden, folglich enthält er den für den konjugativen Transfer nötigen *oriT* (Origin of DNA-Transfer = Ursprung oder Startpunkt des DNA-Transfers). Als Selektionsmarker erhält pKC1132 ein Apramycin-Resistenzgen. Eine Ampicillinresistenz wird jedoch nicht vermittelt. Deshalb wurde das *bla*-Gen unter Verwendung des Primerpaares *bla-up/bla-down* von pBluescript-II-KS (Fa. Stratagene) mit *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde gemäß Herstellerprotokoll in pTOPO-blunt kloniert, woraus pMSW21 resultierte. Plasmid pESW224 wurde durch Hydrolyse mit *EcoRI* linearisiert und mit SAP dephosphoryliert. Der so behandelte Vektor wurde mit dem durch *EcoRI*-Restriktion gewonnenen 986 bp großen *bla*-Gen aus pMSW21 ligiert. Dabei wurde Plasmid pMSW3 erhalten. Dieses wurde in *E. coli* S17/1 transformiert, einen Donorstamm, bei dem die für den Transfer nötigen *tra*-Gene im Chromosom integriert sind. Die *tra*-Gene sind für die Synthese des Sexual-Pilus und die Stabilisierung der einzelsträngigen DNA während des Transfers nötig. Eines der *tra*-Gene kodiert eine



Endonuklease, diese erzeugt im Bereich des *oriT* einen Einzelstrangbruch und initiiert so den DNA-Transfer in den Rezipienten (in diesem Fall *M. lichenicola* Me I46).

Versuche *M. lichenicola* Me I46 mit Hilfe biparentaler Konjugation zu transformieren, scheiterten ebenfalls. Hier konnte weder mit 400 µg/ml Streptomycin, noch mit 50 µg/ml Kanamycin erfolgreich gegen den Donorstamm *E. coli* S17/1 selektioniert werden. Aufgrund dieser Befunde sollte durch heterologe Expression von Genen der Melithiazolbiosynthese in *S. aurantiaca* DW4/3-1 bewiesen werden, dass das korrekte Gencluster kloniert wurde.

### 3.22 Heterologe Expression von MelB in *S. aurantiaca* DW4/3-1

Der phylogenetische Vergleich der Domänen von MtaB und MelB legt die Vermutung nahe, dass MelB durch Deletion der beiden ersten Module und der reduktiven Schleife des zweiten Extensionsmoduls aus MtaB hervorgegangen ist (siehe 4.11.3). Die Insertion der entsprechenden DNA-Abschnitte in *melB* ist ebenfalls denkbar. Um diese Hypothesen zu untersuchen, sollte über eine homologe Rekombination *melB* (einschließlich der ORFs 3 und 4) vor *mtaC* eingekreuzt werden (siehe Abbildung 3.55).

Die Fusion zwischen MelB und MtaB erfolgte so, dass der C-terminale Linker (ca. 20 Aminosäuren) von MtaB erhalten bleibt (siehe (Bohm *et al.*, 1998; Mootz *et al.*, 2000) und Abbildung 3.55). Für die homologe Rekombination war ein 1415 bp umfassender Genabschnitt vom 5'-Ende von *mtaC* vorgesehen. Ob der zwischen ORF4 und *melB* vermutete bidirektionale Promotor in *S. aurantiaca* DW4/3-1 erkannt wird, lässt sich mit diesem Ansatz ebenfalls klären.

Da nach der Integration des Mutageneseplasmides in den Wildtypen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 sowohl von *mtaB* als auch von *mtaC* eine intakte Kopie im Chromosom verbleibt (siehe Abbildung 3.55 C), sollte diese Mutante zusätzlich zu Myxothiazol ein Derivat produzieren, bei dem die Nonadienylseitenkette durch einen Isopropylrest ersetzt ist. Um eine Mutante zu erzeugen, die ausschließlich das erwartete Derivat produziert, wurde das Mutageneseplasmid zusätzlich in die Mutante ESW414 (zur Konstruktion der Mutante siehe 3.9) elektroporiert. Diese

Mutante hat aufgrund der in *mtaB* durchgeführten Mutagenese die Fähigkeit zur Myxothiazolbildung verloren.

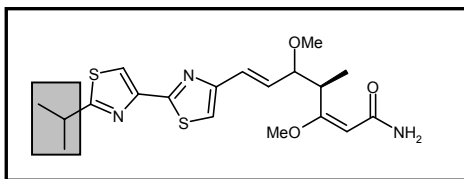


Abbildung 3.54 Myxothiazolderivat mit verkürzter Seitenkette. Der Molekülbereich, in dem sich das Derivat von Myxothiazol unterscheidet, ist grau unterlegt. Erklärung siehe Text

### 3.22.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pMSW17

Mit dem Primerpaar ML3/ML4 und *Pfu* DNA-Polymerase wurde von Cosmid E25 ein 1,4 kb bp großes PCR-Amplifikat erzeugt. Aus der Klonierung dieses PCR-Produktes resultierte pESW232, dessen Insert durch DNA-Sequenzierung verifiziert wurde (siehe Abbildung 3.55 A).

Unter Verwendung der Primerkombination MLB1FOR/ML2 wurde mit Elongase (Fa. Gibco) von Cosmid M1 ein 4,9 kb großes PCR-Produkt amplifiziert. Dieses wurde gemäß Herstellerprotokoll in pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO kloniert, woraus die Plasmide pMSW15 und pMSW16 resultierten. Die Inserts beider Klone wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Das Insert von pMSW15 zeigte in den Positionen 2138 und 2550 Abweichungen von der Ausgangssequenz. In Position 3854 des Inserts von pMSW16 wurde ebenfalls ein ungewollter Nukleotidaustausch gefunden. Um ein Mutageneseplasmid zu erzeugen, das komplett mit der Originalsequenz übereinstimmt, wurde pMSW16 mit *Pst*I und *Xba*I restringiert. Das dabei erhaltene 7,2 kb große (fehlerfreie) DNA-Fragment diente später als Vektor. Plasmid pMSW15 wurde mit *Pst*I und *Mfe*I hydrolysiert, wobei ein 1,2 kb großes (fehlerfreies) DNA-Fragment entsteht. Durch Restriktion von pESW232 mit *Mfe*I und *Xba*I wurde das 1,4 kb große Insert erhalten. Beide Fragmente wurden gemeinsam in das Rückgrat von pMSW16 kloniert, woraus pMSW17 resultierte.

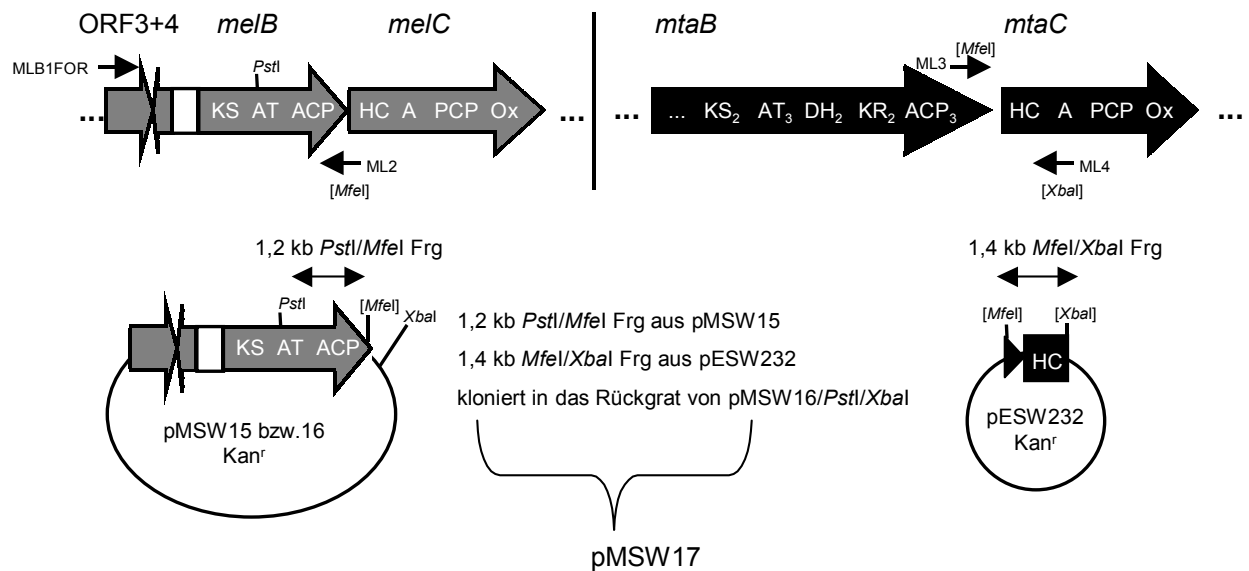
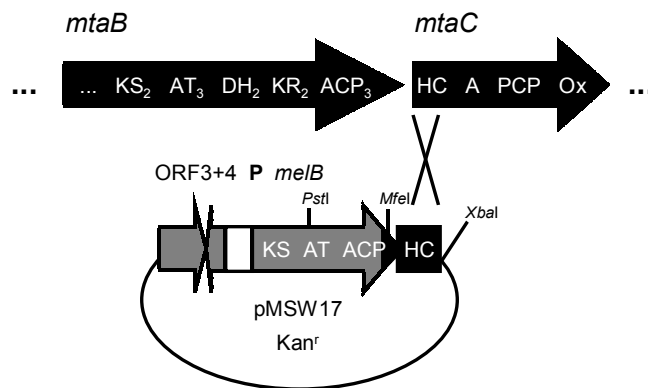
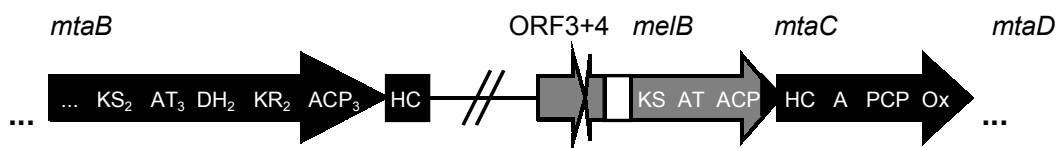
**A** Konstruktion von pMSW17*Melittangium lichenicola* Me l46*Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1**B** Transformation von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit pMSW17**C** Genotyp der Mutante ESW613

Abbildung 3.55 Heterologe Expression von MelB in *S. aurantiaca* DW4/3-1. Gene und Genabschnitte aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 sind schwarz dargestellt. Aus *M. lichenicola* Me l46 stammende Gene und Genabschnitte sind grau dargestellt. Die Promotorregion ist weiß dargestellt. Die mit Hilfe der PCR erzeugten Schnittstellen sind in eckigen Klammern angegeben. (Frg: DNA-Fragment)

### 3.22.2 Konstruktion und Analyse der Mutanten

Elektrokompetente Zellen des Wildtyps von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und der Mutante ESW414 wurden mit pMSW17 transformiert (zur Vorgehensweise siehe 2.15). Die ortsspezifische Integration des Mutageneseplasmides wurde durch Southern Blot Analyse verifiziert. Genotypisch korrekte Mutanten wurden mit Hilfe der DAD gekoppelten HPLC phänotypisch analysiert. Die vom Wildtyp abgeleiteten Mutanten (ESW613-620) waren Myxothiazol-positiv. Dieses Ergebnis zeigt, dass der aus *M. lichenicola* Me I46 stammende Promotor in *S. aurantiaca* DW4/3-1 erkannt wird.

Das erwartete Isopropyl-Derivat des Myxothiazols konnte auch in der HPLC-MS Analyse nicht detektiert werden. In den Extrakten der aus der Mutante ESW414 hervorgegangenen Doppelmутanten (ESW643-648) konnte mit Hilfe der DAD gekoppelten HPLC weder Myxothiazol noch dessen Isopropyl-Derivat detektiert werden.

Bei Untersuchungen zur Herkunft der Startereinheit der Myxothiazolbiosynthese war der Verdacht aufgekommen, dass *S. aurantiaca* DW4/3-1 nicht in der Lage ist, aus Valin Isobutyryl-CoA zu gewinnen (RM, persönliche Mitteilung). Um einen Mangel an dieser Vorstufe auszuschließen, wurden Produktionskulturen der Einfach- und der Doppelmутanten mit 1mM Isobuttersäure supplementiert. In den methanolischen Extrakten dieser Zellen konnte dennoch kein Myxothiazol-Derivat mit verkürzter Seitenkette detektiert werden.

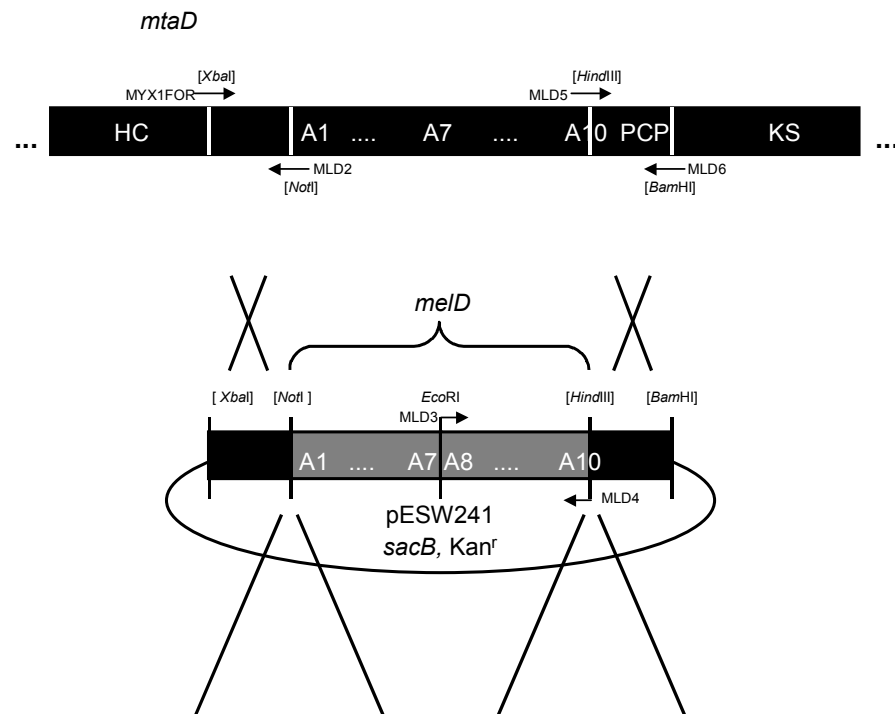
### 3.23 Substitution der Adenylierungsdomäne in MtaD durch die Adenylierungsdomäne aus MelD

Da die von *M. lichenicola* Me I46 produzierten Melithiazole alle ein Thiazolin-Thiazol-System enthalten, war es verwunderlich, dass MelC ebenso wie MtaC eine mögliche Oxidationsdomäne Domäne enthält. Die *in vivo* Experimente hatten gezeigt, dass die Oxidationsdomäne von MtaC entbehrlich für die Myxothiazol Biosynthese ist. Da im Sequenzvergleich zwischen den Ox Domänen von MtaC und MelC keine signifikanten Unterschiede erkennbar sind und beide C-terminal vom PCP lokalisiert sind, wurde spekuliert, dass die Ox Domäne von MelC ebenfalls entbehrlich oder

[illegible]

Abbildung 3.56 Sequenzvergleich von MelD und MtaD im N-terminalen Bereich der inserierten Ox Domänen. Das hochkonservierte Motiv A8, der Abschnitt, in dem die Deletionen vermutet werden, und das hochkonservierte Motiv Ox-1 sind grau unterlegt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern, ähnliche Aminosäuren mit einem Doppelpunkt markiert. Bezogen auf die Nummerierung der Ox Domäne von MtaD sind in Position 12 eine Aminosäure und ab der Position 21 zehn Aminosäuren deletiert.

Wildtyp *S. aurantiaca* DW4/3-1



Originalsequenz

<i>mtaD</i>	CAG GCC GAG CGT CAA	AAG GTG GAT
MtaD	F L R Q A E R Q P	S N G K V D
<i>melD</i>	CAG <u>GCG GCC</u> GCG CGG	AAG GTG GAT
MelD	F L R Q A A A R P	A N G K V D

Mutagenisierte  
Sequenz

<i>mtaD</i>	CAG <u>GCG GCC GCT</u>	<u>AAG CTT</u> GAT
MtaD	F L R Q A A A	S N G K L D
<i>melD</i>	NotI-Schnittstelle kommt natürlich vor	<u>AAG CTT</u> GAT
MelD		A N G K L D
nach dem Zusammenfügen ergibt sich	CAG <u>GCG GCC GCT</u>	<u>AAG CTT</u> GAT
	F L R Q A A A R P	A N G K L D R

GCGGCCGC: NotI Erkennungssequenz  
AAGCTT: HindIII Erkennungssequenz

Abbildung 3.57 Mutagenese-Schema zur Substitution der Adenylierungsdomäne in MtaD durch die Adenylierungsdomäne aus MelD. Gene und Genabschnitte aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 sind schwarz dargestellt. Der aus *M. lichenicola* Me I46 stammende Genabschnitt ist grau dargestellt. Die mit Hilfe der Primer erzeugten Schnittstellen sind in eckigen Klammern angegeben.

### 3.23.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW241

Unter Verwendung der Primer MYX1FOR und MLD2 wurde mit *Pfu* DNA Polymerase von Cosmid E25 ein 631 bp großes PCR-Produkt erzeugt, welches für das C-terminale Ende der Heterozyklisierungs-Domäne von MtaD kodiert. Aus der Klonierung des PCR-Amplifikates in pCR®-2.1-TOPO resultierte Plasmid pESW236

(siehe Abbildung 3.58). Mit dem Primerpaar MLD3 und MLD4 wurde ein 1088 bp großes PCR-Amplifikat von Cosmid M2 gewonnen. Dieser Genabschnitt kodiert für den C-terminalen Teil der Adenylierungsdomäne von MelD. Durch Klonierung dieses PCR-Produktes in pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO wurde Plasmid pESW225 erhalten (siehe Abbildung 3.58). Unter Verwendung der Primer MLD5 und MLD6 wurde mit Cosmid E25 als Matrize ein 620 bp großes PCR-Amplifikat gewonnen, das den für die PCP Domäne von MtaC und die KS Domäne von MtaD kodierenden Abschnitt trägt. Aus der Klonierung des PCR-Produktes in pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO ging Plasmid pESW237 hervor. Die drei o.a. Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

Das Insert aus pESW236 wurde durch Restriktion mit *Xba*I und *Not*I gewonnen. Durch Hydrolyse von Cosmid M2 mit *Not*I und *Eco*RI wurde ein 1148 bp großes Fragment erhalten, welches gemeinsam mit o.a. Fragment in den mit *Xba*I und *Eco*RI geöffneten pBluescript<sup>®</sup>IIS(-) kloniert wurde. Es resultierte Plasmid pMSW5, das durch Restriktionsanalyse und DNA Sequenzierung verifiziert wurde. Anschließend wurde pMSW5 mit *Eco*RI und *Hind*III restringiert und mit dem entsprechend gewonnenen Fragment aus pESW225 ligiert. Daraus resultierte Plasmid pMSW6. Dessen Insert wurde durch Hydrolyse mit *Xba*I und *Hind*III gewonnen. Um das Insert aus pESW237 zu erhalten, wurde mit *Hind*III und *Bam*HI restringiert. In einer gerichteten Klonierung wurden beide Fragmente gemeinsam in den mit *Xba*I und *Bam*HI hydrolysierten pSWU41 kloniert. Daraus resultierte Plasmid pESW241.

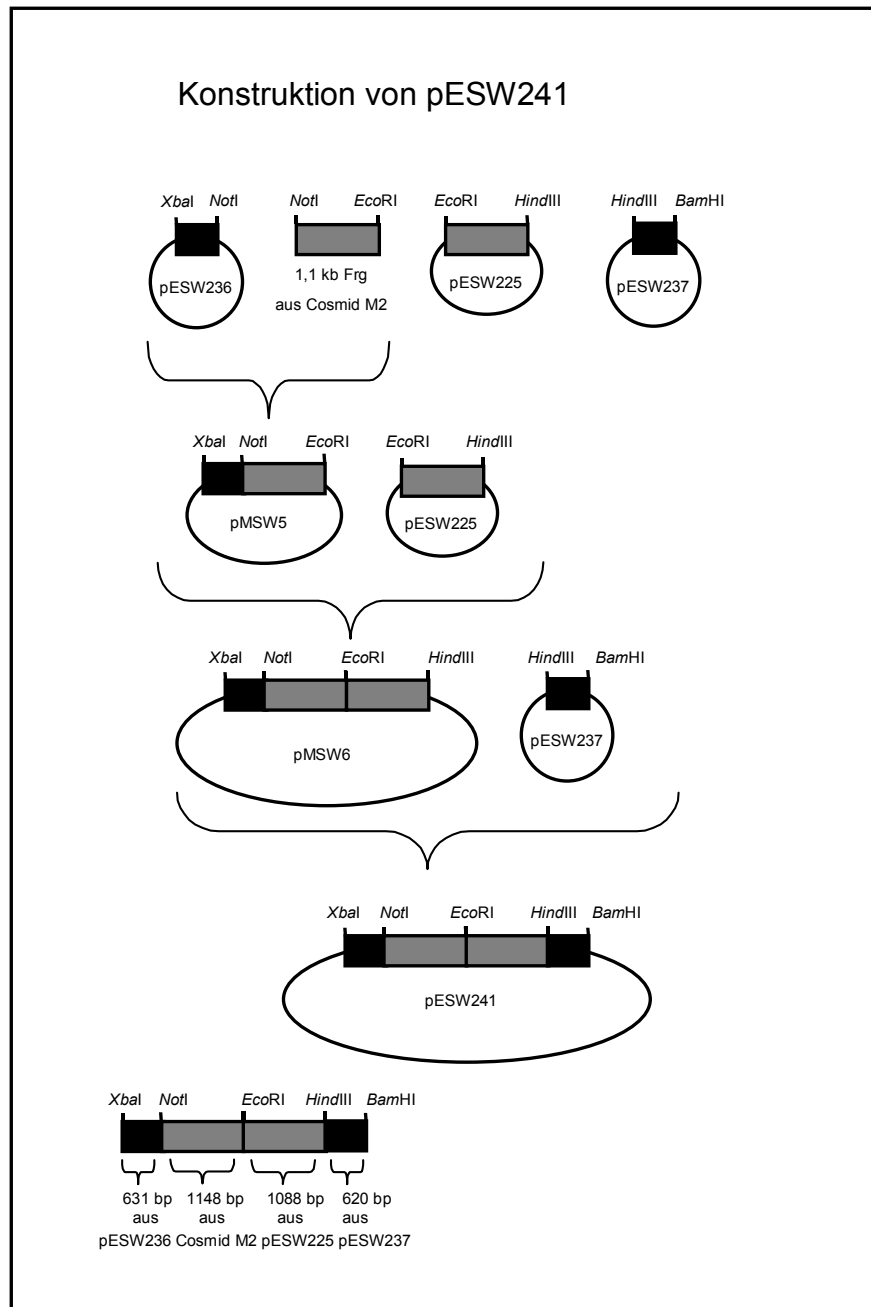


Abbildung 3.58 Klonierungsstrategie zur Erzeugung von pESW241. Die aus *M. lichenicola* Me l46 stammenden DNA-Abschnitte sind grau dargestellt. Schwarz abgebildet sind die DNA Fragmente, die aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 stammen.

### 3.23.2 Konstruktion der Mutante

*S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde wie unter 2.15 beschrieben mit pESW241 transformiert. Die chromosomale DNA der resultierenden Kanamycin-resistenten Klone wurde isoliert und genotypisch analysiert. Die Southern Blot Analyse zeigte für



die Mutanten ESW609 und ESW610 die ortsspezifische Integration von pESW241. Die merodiploide Mutante ESW609 zeigte ein Hybridisierungsmuster, welches für ein Einkreuzen des Mutageneseplasmides am 5'-Ende des Inserts von pESW241 erwartet wurde (siehe Abbildung 3.59). Im Gegensatz dazu hatte in der merodiploiden Mutante ESW610 am 3'-Ende des Inserts von pESW241 die Kointegratbildung stattgefunden. Ausgehend von diesen genotypisch korrekten merodiploiden Mutanten wurden gemäß dem beschriebenen Protokoll Mutanten abgeleitet, die nach der zweiten homologen Rekombination die geplante Veränderung im Genotyp zeigten (ESW626 geht aus ESW609 hervor und ESW632 aus ESW610).

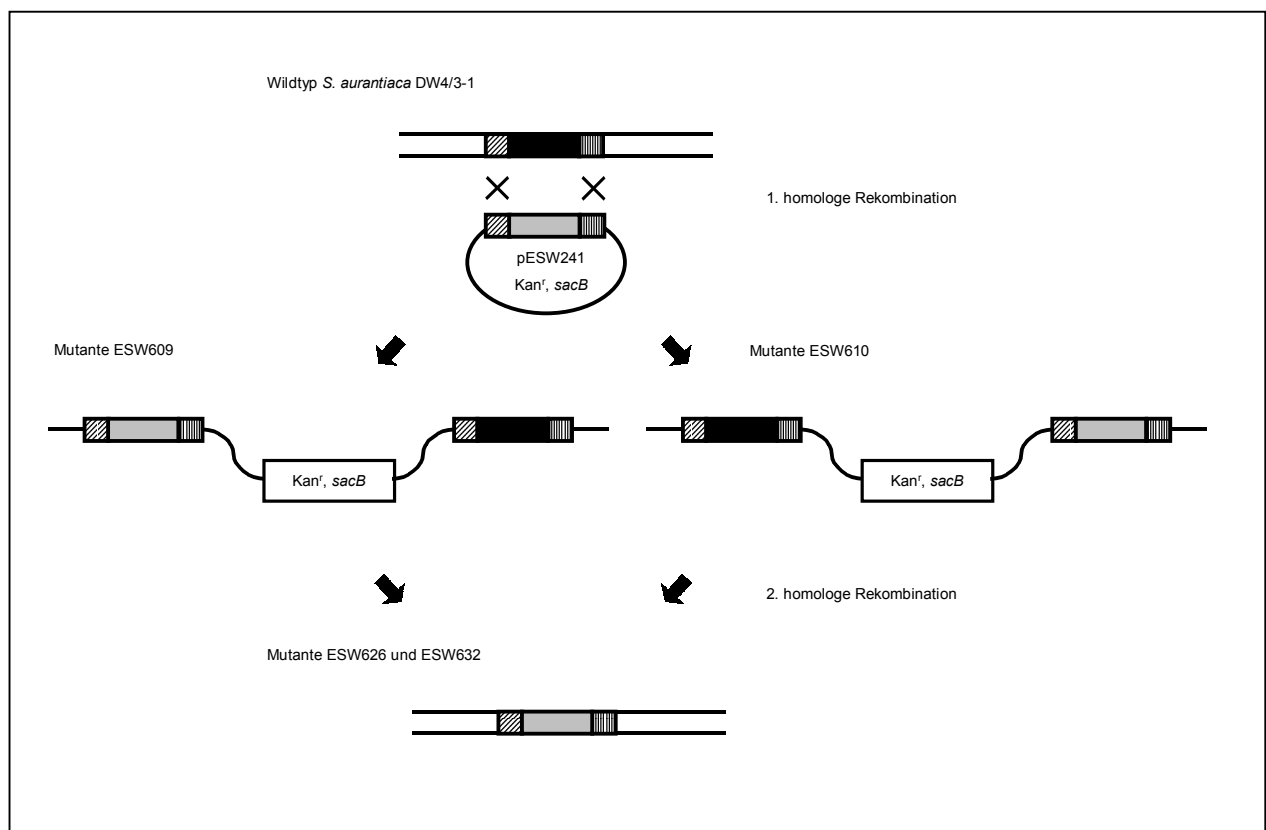


Abbildung 3.59 Schematische Darstellung der verschiedenen Genotypen von ESW609 und ESW601. Genabschnitte aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 sind schwarz dargestellt. Die für die homologen Rekombinationen vorgesehenen Bereiche sind zusätzlich schraffiert abgebildet. Der aus *M. lichenicola* Me I46 stammende Genabschnitt ist grau dargestellt.

### 3.23.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

In den nach der zweiten homologen Rekombination entstandenen Mutanten ESW626 und ESW632 konnte weder Myxothiazol noch das erwartete Thiazolin-Thiazol-Derivat detektiert werden.

### 3.24 Untersuchung zur Entstehung des Methylesters von Melithiazol

Alle Melithiazole besitzen einen „endständigen“ Methylester. Da die Abfolge der Gene *mtaB-mtaG* bzw. *melB-melG* übereinstimmt, könnte die Bildung dieses Strukturelementes über ein Melithiazol-Amid ablaufen. Um zu untersuchen, ob *melJ* und *melK* eine solche Umwandlung katalysieren können, sollten beiden Gene heterolog in *S. aurantiaca* DW4/3-1 exprimiert werden. Nach der homologen Rekombination sollte eine Mutante entstehen, die zusätzlich oder ausschließlich Myxothiazol Z (das Methylesteranalogon zu Myxothiazol A) produziert (siehe Abbildung 3.60). Mit diesem Versuchsansatz lässt sich ebenfalls überprüfen, ob der zwischen *melK* und ORF7 vermutete bidirektionale Promotor in *S. aurantiaca* DW4/3-1 erkannt wird.

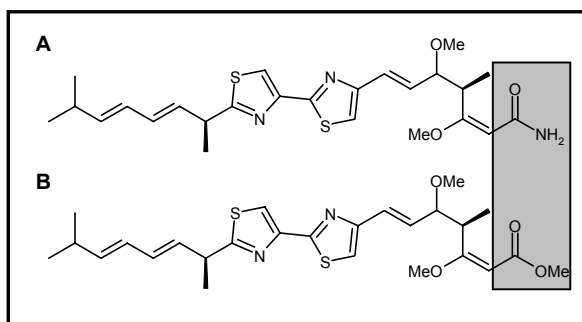


Abbildung 3.60 Vergleich der Myxothiazole A und Z. (A) zeigt das Säureamid Myxothiazol A. In (B) ist dessen Methylesteranalogon das Myxothiazol Z dargestellt. Der Bereich in dem sich beiden Strukturen unterscheiden ist grau unterlegt.

#### 3.24.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pESW243

Bei der Restriktion von Cosmid M1 mit *StuI* entstehen vier 3,1 bis 3,2 kb große DNA-Fragmente, welche gelelektrophoretisch kaum zu trennen sind. Das zu klonierende DNA-Fragment enthält *melJ* und *melK* sowie das am 5'-Ende um 309 bp verkürzte *melH* (siehe Abbildung 3.61). Außerdem trägt das Fragment 670 bp eines Bereiches,

in dem ein bidirektioneller Promotor vermutet wird. Nach der Restriktion der Cosmid-DNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA gefällt (Sambrook *et al.*, 1989). Das Fragmentgemisch wurde mit Hilfe der SAP dephosphoryliert und dann einer Extension mit *Taq* DNA-Polymerase unterzogen. Um eine optimale Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase im SAP-Reaktionspuffer zu gewährleisten, wurde dieser auf eine Endkonzentration von 50 mM KCl eingestellt. Nach Zugabe von dNTPs und 1U *Taq* DNA-Polymerase wurde 15 min bei 72°C inkubiert. Die vier DNA-Fragmente wurden dann gemäß Hersteller-Protokoll in pCR®-XL-TOPO kloniert. Die erhaltenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert. Plasmid pMSW12 enthielt das gewünschte DNA-Fragment. Aus den Untersuchungen zur ungewöhnlichen Lage der Doppelbindungen im vorderen Molekülteil von Myxothiazol war bekannt, dass eine Inaktivierung von *mtaH* keine Auswirkung auf die Myxothiazolbiosynthese hat (siehe 3.14). Deshalb wurde dieses Gen zum Einkreuzen der zusätzlichen Gene ausgewählt. Bei den Versuchen pMSW12 im Bereich von *melH* "heterolog" (Identität von 78,6 % über 680 bp auf DNA-Ebene) über *mtaH* in das Chromosom von *S. aurantiaca* DW4/3-1 einzukreuzen, wurden lediglich merodiploide Mutanten mit unklaren Genotypen erhalten. Um eine homologe Rekombination sicherzustellen, wurde das Insert aus pESW26 (siehe 3.14.1) mit *NotI* und *SpeI* ausgeschnitten und in das mit *NotI* und *XbaI* geöffnete pMSW12 kloniert. Es resultierte Plasmid pESW243.

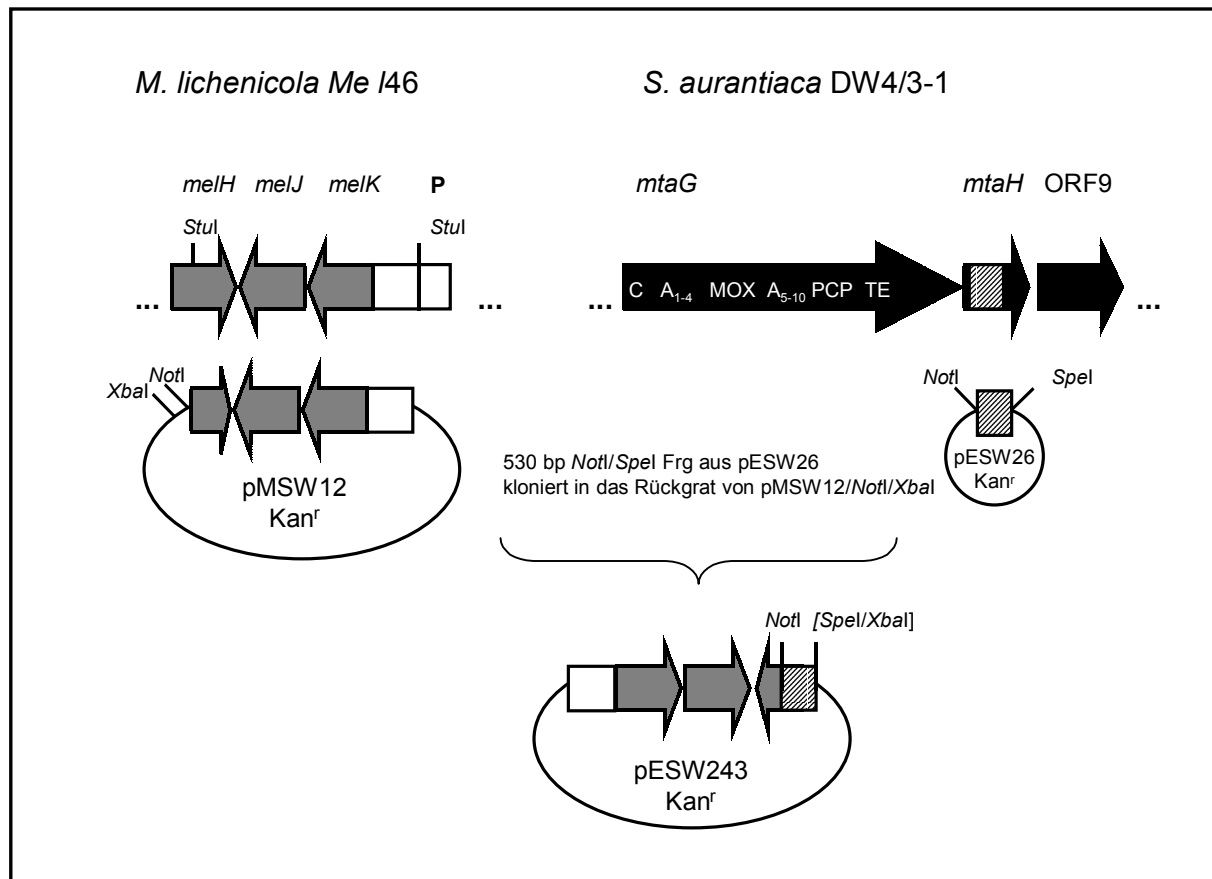


Abbildung 3.61 Klonierungsstrategie zur Erzeugung von pESW243. Die aus *M. lichenicola* Me I46 stammenden Gene und Gen-Abschnitte sind grau dargestellt. Schwarz abgebildet sind die Gene, die aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 stammen. (Frg: DNA-Fragment).

### 3.24.2 Konstruktion der Mutante *mtaH*::pESW234

*S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde wie unter 2.15 beschrieben mit pESW243 transformiert. Die chromosomale DNA der resultierenden Kanamycin-resistenten Klone wurde isoliert und genotypisch analysiert. Die Southern Blot Analyse zeigte für die Mutante ESW602 die ortsspezifische Integration von pESW243 (siehe Abbildung 3.62). Als Sonde diente das 3,2 kb *StuI*/*StuI*-DNA-Fragment aus pMSW12. Aufgrund der oben erwähnten hohen Ähnlichkeit zwischen *melH* und *mtaH* zeigt auch *S. aurantiaca* DW4/3-1 ein Signal.

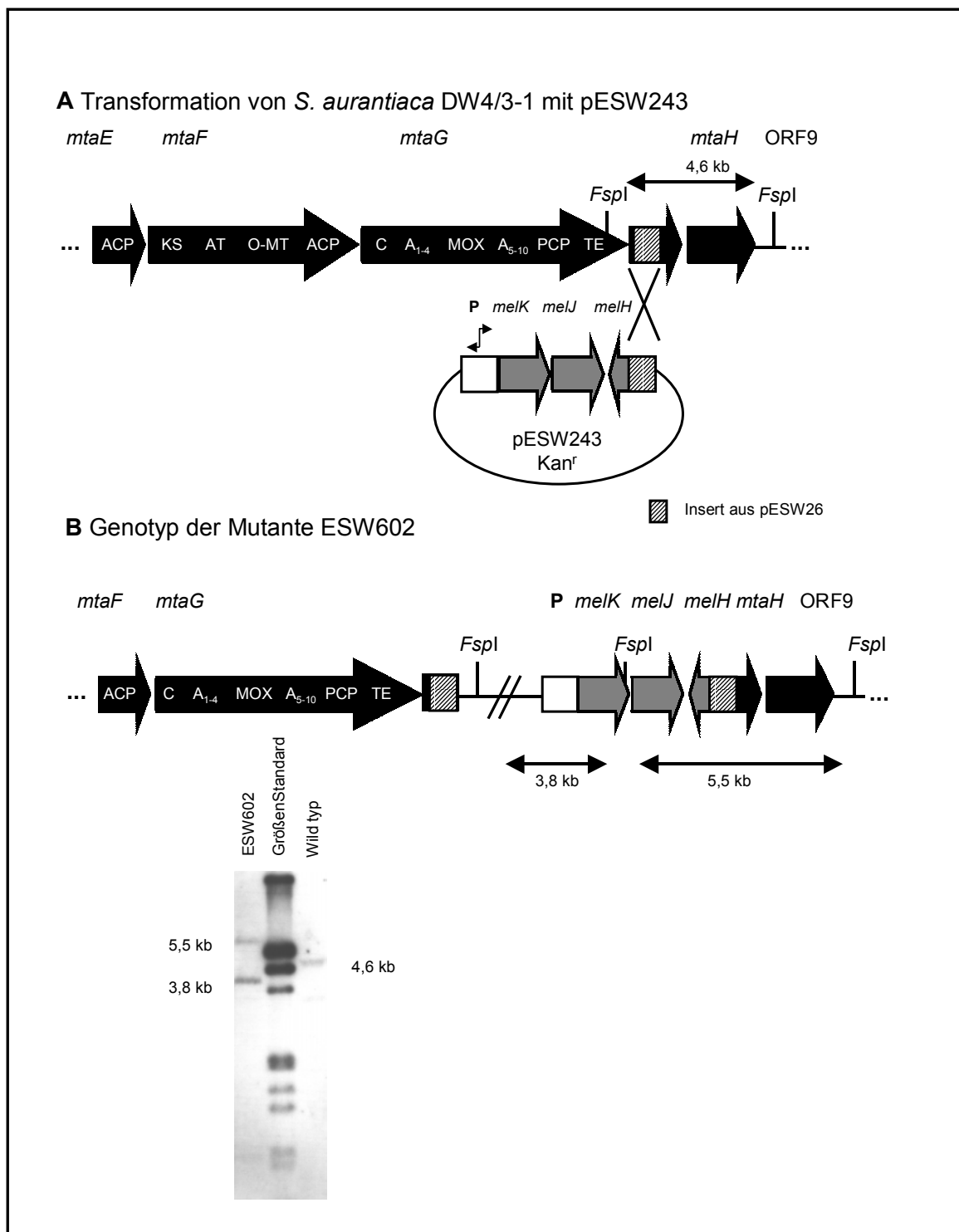


Abbildung 3.62 Heterologe Expression von MelK und MelJ in *S. aurantiaca* DW4/3-1. Gene sind als Pfeile dargestellt. Der Abschnitt von *mtaH*, der für die Integration genutzt wurde, ist schraffiert abgebildet. P symbolisiert den bidirektionalen Promotor, der die Transkription von *melK* und *melJ* reguliert. Gene und Genabschnitte aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 sind schwarz dargestellt. Aus *M. lichenicola* Me I46 stammende Gene und Genabschnitte sind grau dargestellt. (B) Das Insert von pESW243 wurde bei der Southern Blot Analyse als Gensonde eingesetzt. Die Restriktion erfolgte mit *FspI*. Die Abschätzung der Signalgrößen erfolgte durch Vergleich mit dem DIG-markierten DNA-Größenstandard III der Fa. Roche Diagnostics.

### 3.24.3 Analyse der Produktbildung in den Mutanten

Die mit Hilfe der DAD gekoppelten HPLC durchgeführte phänotypische Analyse zeigte, dass die Mutante ESW602 Myxothiazol Z (das Methylester Analogon von Myxothiazol A) als Hauptkomponente produzierte. Myxothiazol A wurde nur noch als Nebenkomponekte gebildet. Die Chromatogramme sind in Abbildung 3.63 dargestellt. Als Standard diente der methanolische Extrakt von *Myxococcus fulvus* Mx f333/8. Dieser Stamm produziert natürlicherweise die Myxothiazole A und Z (Steinmetz *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde die Identität von Myxothiazol Z durch HPLC-MS Analyse bestätigt (M 502+1). Die heterolog exprimierten Proteine MelJ und MelK haben Myxothiazol A zum Großteil in sein Methylester Analogon überführt. In einer analogen Reaktion sollte die Bildung der endständigen Methylestergruppe in der Melithiazolbiosynthese ablaufen. Dieses Ergebnis beweist, dass tatsächlich das Melithiazol-Biosynthesegencluster kloniert und sequenziert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der zwischen *melK* und ORF7 vermutete Promotor in *S. aurantiaca* DW4/3-1 erkannt wird.

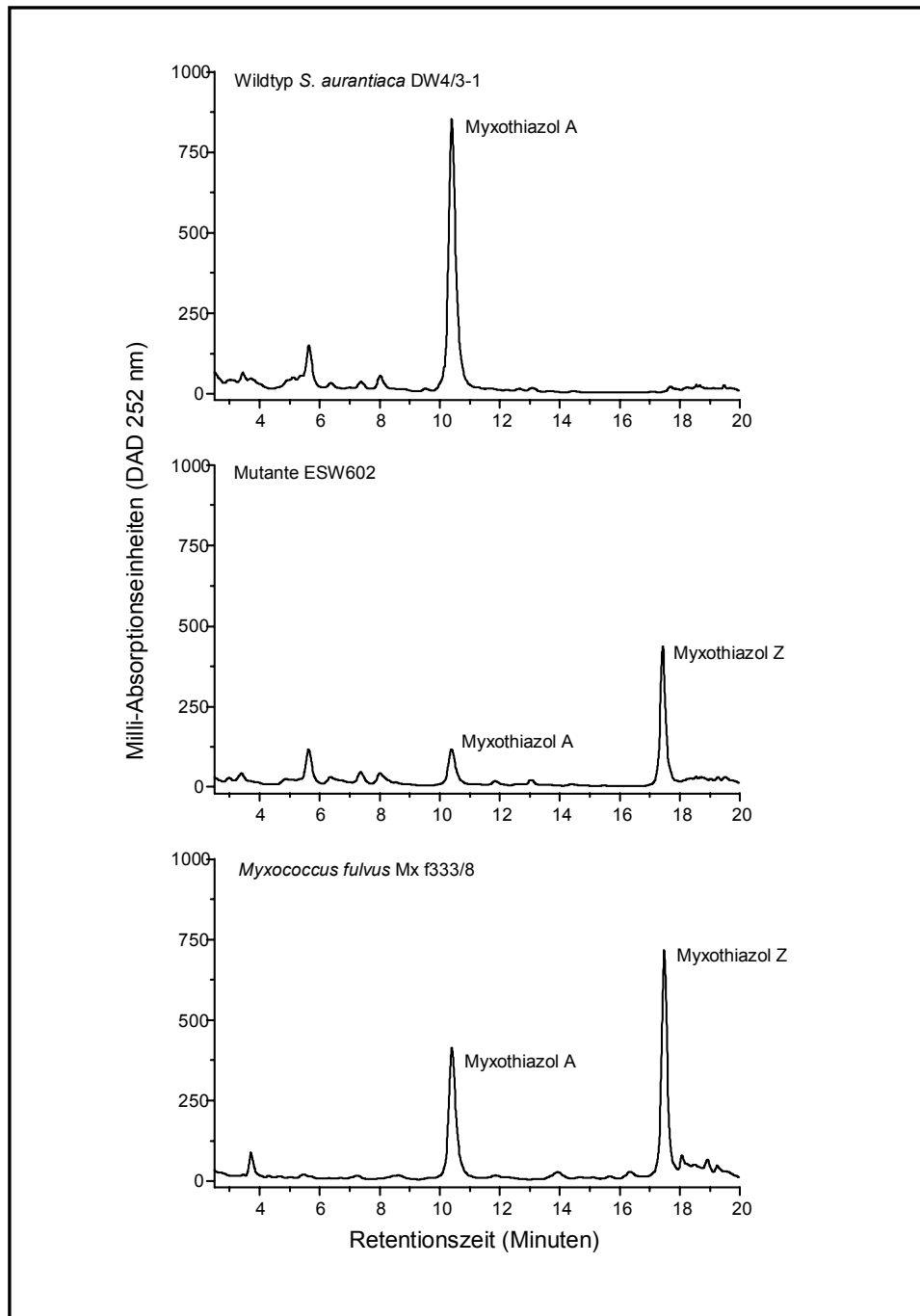


Abbildung 3.63 HPLC Analyse der Extrakte von *S. aurantiaca* DW4/3-1, der Mutante ESW602 und *M. fulvus* Mx f 333/8. *M. fulvus* Mx f 333/8 produziert natürlicherweise die Myxothiazole A und Z und diente bei der phänotypischen Analyse als Standard.

### 3.25 Weitere Untersuchungen zu Bildung des terminalen Methylesters

Um die bei der Umwandlung des Säureamides in den Methylester durchlaufene Zwischenstufe zu erfassen, wurden MelJ und MelK separat in *S. aurantiaca* DW4/3-1

heterolog exprimiert. Sollte das von Höfle und Mitarbeitern formulierte Postulat (Steinmetz *et al.*, 2000) zutreffen, müsste die Mutante, in der MelK exprimiert wird, einen Methyl-Iminoester produzieren (siehe Abbildung 4.6). Sollte Myxothiazol A zuerst von MelJ umgewandelt werden, ist die Entstehung der freien Säure denkbar.

### **3.25.1 Heterologe Expression von MelK und MelJ $\Delta_{108-335}$ in *S. aurantiaca* DW4/3-1**

Bei der Klonierung des 3,2 kb großen *Stul/Stul*-DNA-Fragmentes in pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO wurde pMSW13 erhalten. Dieses Konstrukt enthält das Insert in der entgegengesetzten Orientierung wie pMSW12. Durch die Restriktion mit *Bam*HI und die anschließende Religation wurde ein 1,4 kb DNA-Fragment deletiert (siehe Abbildung 3.64). Auf diese Weise wurde *melJ* am 3'-Ende um 687 bp auf 320 bp verkürzt. Es resultierte pMSW13-2. Dieses wurde durch Hydrolyse mit *Not*I und *Xba*I linearisiert und mit dem 530 bp *Not*I/*Spe*I Fragment aus pESW26 ligiert, wobei pMSW20 erhalten wurde. Die Erzeugung der Mutanten erfolgte wie unter 2.15 beschrieben. Die erhaltenen Mutanten waren Myxothiazol-positiv, der erwartete Iminoester (Steinmetz *et al.*, 2000) konnte mit Hilfe der HPLC-MS Analyse nicht nachgewiesen werden (M 501+1).



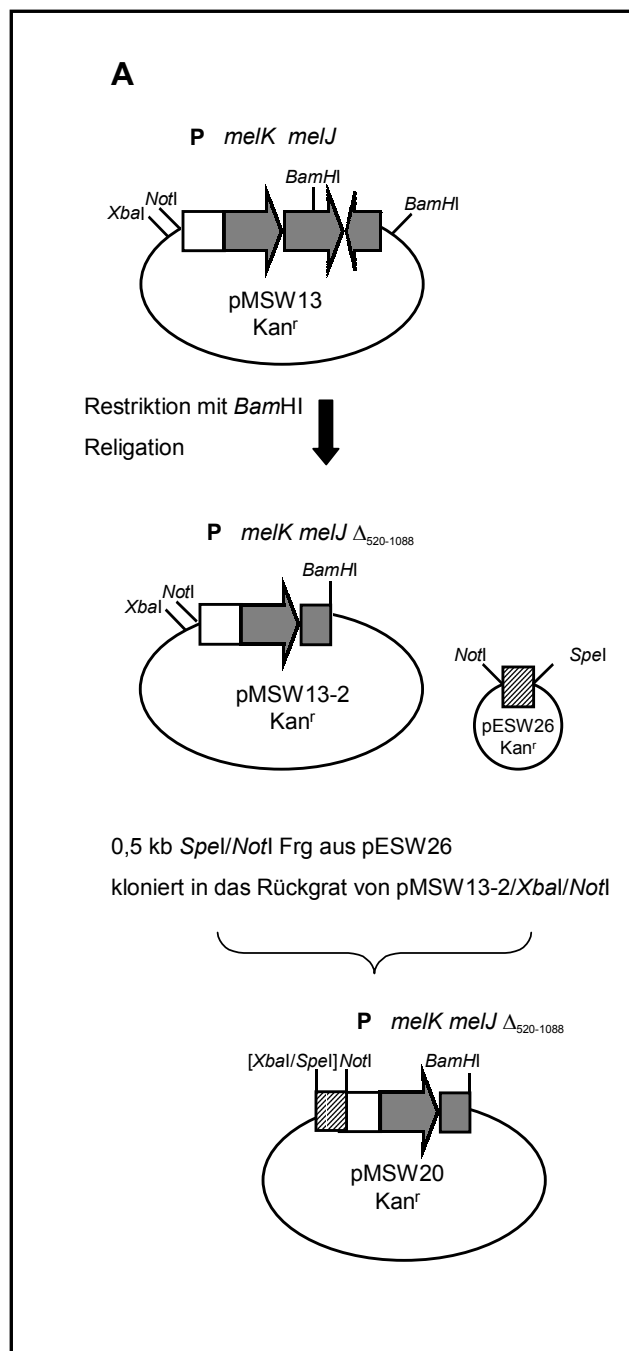


Abbildung 3.64 Konstruktion von Plasmid pMSW20. Die grau dargestellten Pfeile symbolisieren die aus *M. lichenicola* Me I46 stammenden Gene. Der Bereich, in dem ein bidirektionaler Promotor vermutet wurde, ist weiß abgebildet. Die schraffierte Fläche symbolisiert den Genabschnitt von *mtaH*, der die homologe Rekombination ermöglicht (Frg: DNA-Fragment).

### 3.26 Untersuchung zur Herkunft der Startereinheit der Melithiazolbiosynthese durch Fütterung von D8-DL-Valin

Die Myxothiazolbiosynthese startet mit einer 3-Methylbutyryl-CoA Einheit, welche von Leucin abgeleitet ist (Trowitzsch-Kienast *et al.*, 1986). Für den Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren ist der Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase Complex (bkd-Locus) verantwortlich (Stryer, 1999). Durch Transaminierung entsteht aus der Aminosäure zunächst die entsprechende  $\alpha$ -Ketosäure, aus der durch oxidative Decarboxylierung der CoA-Ester der um einen Kohlenstoff verkürzten Carbonsäure hervorgeht. Später konnte durch die Fütterung von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Acetat in einer bkd-Mutante von *S. aurantiaca* DW4/3-1 gezeigt werden, dass ein weiterer, bis dahin unbekannter Stoffwechselweg zur Bildung von 3-Methylbutyryl-CoA führt (Mahmud *et al.*, 2002). Für die Melithiazol A Biosynthese wurde als Startereinheit eine oxidierte Isobutyrateinheit vermutet, die in analoger Weise aus Valin hervorgehen könnte. Durch die Fütterung von *M. lichenicola* Me l46 mit D8-DL-Valin sollte diese Hypothese untersucht werden. In der HPLC-MS Analyse wurde deuteriertes Melithiazol A mit dem erwarteten Massen-Shift von 5 Einheiten nachgewiesen (siehe Abbildung 3.65).

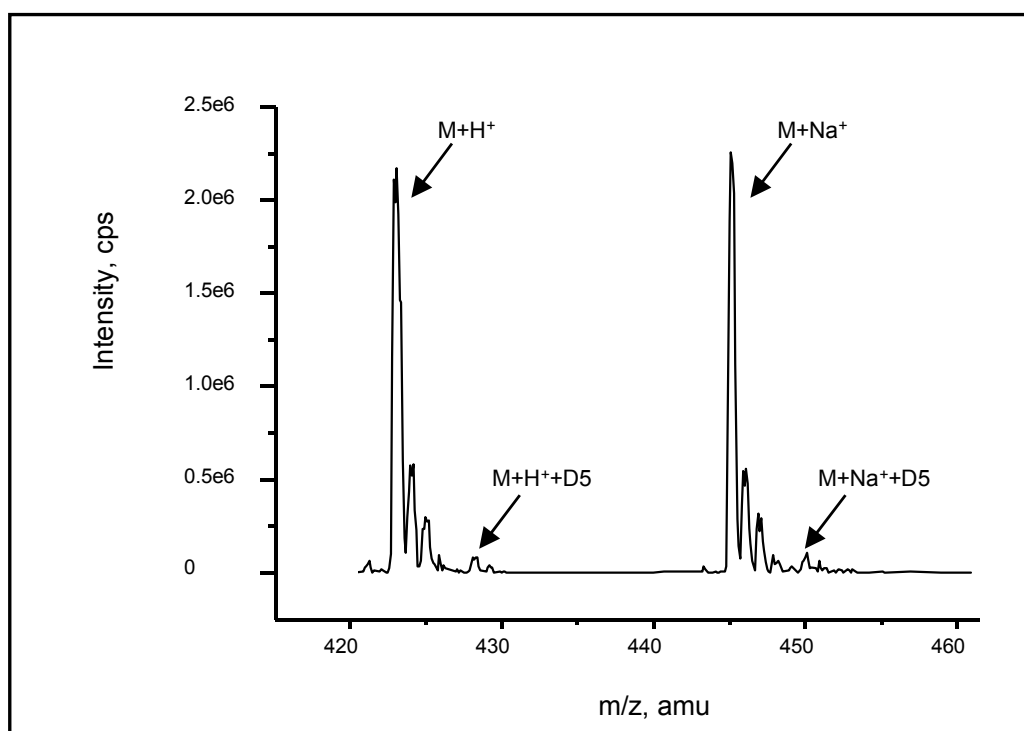


Abbildung 3.65 Massenspektrum des isolierten Melithiazols nach Fütterung von D8-DL-Valin. Die Einbaurrate betrug 5%. Für das unmarkierte Melithiazol gilt  $M+H^+=423$  und  $M+Na^+=445$ . Für das deuterierte Melithiazol gilt  $M+H^++D_5=428$  und  $M+Na^++D_5=450$ .

Durch Fütterung von D8-DL-Valin und anschließende HPLC-MS Analyse konnte bewiesen werden, dass Valin eine Quelle für die Startereinheit ist.

### 3.27 Untersuchung zur Herkunft der O-Methylgruppen des Melithiazols durch Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin

Die heterologe Expression von *melJ* und *melK* in *S. aurantiaca* DW4/3-1 hatte bewiesen, dass die beiden abgeleiteten Proteine gemeinsam für die Umwandlung des Amides in den Methylester verantwortlich sind. MelK zeigt Ähnlichkeiten zu zahlreichen, nicht charakterisierten Proteinen, bei denen es sich höchst wahrscheinlich um Methyltransferasen handelt. Der häufigste Cofaktor von Methylierungsreaktionen ist SAM. Eine typische SAM-Bindestelle (Kagan & Clarke, 1994) ist jedoch nicht zu identifizieren. Die Herkunft der endständigen Methylgruppe sollte deshalb durch Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin und die anschließende Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrums untersucht werden (Stryer, 1999).

Durch die Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin konnten alle drei im Melithiazol enthaltenen Methoxygruppen mit  $^{13}\text{C}$  angereichert werden (siehe Abbildung 3.66). Die Einbaurrate betrug berechnet gegen internen Standard 16-21%.

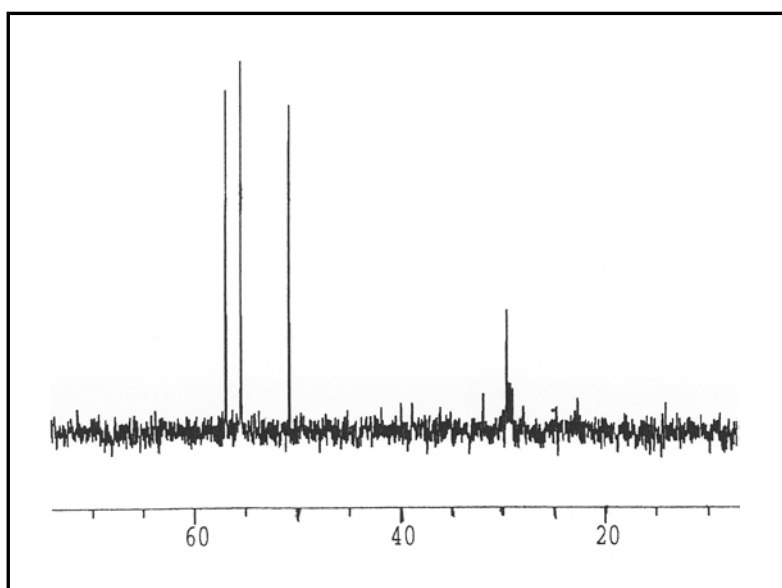


Abbildung 3.66  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum des isolierten Melithiazols nach Fütterung von [ $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin. Die beiden Methoxygruppen verursachen die Signale bei 55,6 und 57,0 ppm. Das Signal der Methylgruppe des Esters liegt bei 50,8 ppm. Als interne Standards dienen die Signale der Kohlenstoffe 4 und 12, deren Signale bei 39,9 und 38,8 ppm erscheinen.

### 3.28 Vergleich beider Biosynthesegencuster

Entsprechend der hohen strukturellen Ähnlichkeit von Myxothiazol und Melithiazol sind auch die für die Biosynthesen verantwortlichen Gene und Proteine sehr ähnlich zueinander (siehe Tabelle 3.11). Da sich die beiden Antibiotika in der Länge der lipophilen Seitenkette unterscheiden, sind auch die korrespondierenden Gene bzw. Proteine weniger ähnlich zueinander. So besteht MtaB aus drei Modulen und MelB aus einem Modul. Es fällt jedoch auf, dass die Domänen von MelB die höchste Identität bzw. Ähnlichkeit zu den homologen Domänen des zweiten Verlängerungsmoduls von MtaB zeigen.

Tabelle 3.11 Vergleich des *mta* und *mel* Biosynthesegencusters

auf DNA-Ebene	Ident. [%]	auf Protein-Ebene	Ident. [%]	Ähnlichk. [%]
<i>melB</i> / <i>mtaB</i>		MelB / MtaB		
KS-AT / KS <sub>2</sub> -AT <sub>3</sub>	73	KS-AT / KS <sub>2</sub> -AT <sub>3</sub>	67	78
ACP / ACP <sub>3</sub>	72	ACP / ACP <sub>3</sub>	64	78
<i>melC</i> / <i>mtaC</i>	71	MelC / MtaC	63	76
<i>melD</i> / <i>mtaD</i>	72	MelD / MtaD	60	72
<i>melE</i> / <i>mtaE</i>	75	MelE / MtaE	66	76
<i>melF</i> / <i>mtaF</i>	77	MelF / MtaF	69	82
<i>melG</i> / <i>mtaG</i>	75	MelG / MtaG	72	83
<i>melH</i> / <i>mtaH</i>	79	MelH / MtaH	72	85

### 3.29 Vergleich der A Domäne

Die spezifitätsbestimmenden Reste in den A Domänen von MtaD und MelD sind identisch (siehe Tabelle 3.12). In den A Domänen von MtaC und MelC stimmen diese bis auf die Position 330, in der Isoleucin in MtaC gegen ein Valin in MelC ausgetauscht ist, überein. Die Anwendung des Spezifitätscodes für A Domänen zeigt für die vier Proteine eine gute Übereinstimmung mit der Konsensussequenz des Cysteins. Dies wurde für die Myxothiazolbiosynthese durch Fütterungsexperimente

bewiesen und kann aufgrund der hohen Ähnlichkeit der beiden Systeme auch auf das Melithiazol übertragen werden. Aufgrund der Insertion der potentiellen MOX Domäne in die A Domänen von MtaG und MelG ist der Spezifitätscode in diesen Proteinen schwer anwendbar. Dennoch scheint Glycin das wahrscheinlichste Substrat zu sein. Fütterungsversuche mit  $^{15}\text{N}$  markierten Aminosäuren, die von unserem Kooperationspartner T. Mahmud durchgeführt wurden, bestätigten diesen Verdacht für die MTAS.

Tabelle 3.12 Vergleich der spezifitätsbestimmenden Aminosäuren der A Domänen der MTAS und der MELS. Die Nummerierung bezieht sich auf die Phenylalanin-spezifische A Domäne der Gramacidinsynthetase(Conti *et al.*, 1997).

Position		235	236	239	278	299	301	322	330
MtaC	Cystein	D	LH	YFE	NS	MLD	SIV	LMG	I
MelC	Cystein	D	L	Y	N	M	S	L	V
MtaD	Cystein	D	L	Y	N	L	S	L	I
MelD	Cystein	D	L	Y	N	L	S	L	I
Consensus Glycin		D	LI	FLQ	NQM	NLF	AGV	LA	TIM
mtaG	Glycin	D	I	L	Q	L	G	M	I
melG	Glycin	D	I	L	Q	L	G	M	I

## **4 Diskussion**

### **4.1 Das Myxothiazol-Biosynthesegencluster**

Bei Beginn der praktischen Arbeiten zur vorliegenden Studie war über die Molekularbiologie der Naturstoffbiosynthese in Myxobakterien sehr wenig bekannt. Die Biosynthesegencluster aus anderen Bakterien und Pilzen, die für die Produktion diverser Sekundärmetabolite verantwortlich sind, wurden dagegen intensiv untersucht (Cane, 1997).

Das Myxothiazol-Biosynthesegencluster war das erste myxobakterielle Biosynthesegencluster, das vollständig kloniert und sequenziert wurde (Silakowski *et al.*, 1999). Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur Teile anderer myxobakterieller Gencluster publiziert worden (Paitan *et al.*, 1999; Pospiech *et al.*, 1996; Schupp *et al.*, 1995). Von den Biosynthesegenclustern des gemischten PKS/NRPS-Typs war es eines der ersten, dessen komplette Sequenz publiziert wurde (Rapamycin - (Molnar *et al.*, 1996); Yersiniabactin - (Gehring *et al.*, 1998; Gehring *et al.*, 1998); Mycobactin - (Quadri *et al.*, 1998)).

Die in der Literatur beschriebenen hochkonservierten Motive funktionaler PKSs und NRPSs wurden über Datenbankvergleiche innerhalb der für die Myxothiazolbiosynthese verantwortlichen Proteine mit guter Übereinstimmung gefunden (siehe 3.5). Die identifizierten Proteindomänen lassen sich gut mit der chemischen Struktur des Myxothiazols korrelieren (siehe unten). Zusätzlich zu den bereits bekannten PKS- und NRPS-Domänen wurden zahlreiche neuartige Domänen identifiziert, welche ebenfalls gut mit der Struktur in Einklang zu bringen sind.

### **4.2 Modell der Myxothiazolbiosynthese**

Biogenetisch handelt es sich bei Myxothiazol um ein PK/NRP-Hybrid, dessen schrittweiser Aufbau von insgesamt neun Modulen bewerkstelligt wird. Dabei wird das wachsende Intermediat zunächst von einer PKS (MtaB) auf eine NRPS (MtaC) übertragen. In der von Shen und Mitarbeitern vorgeschlagenen Nomenklatur liegt hier ein PKS/NRPS-Hybrid vom Typ I vor, da ein PKS und ein NRPS Modul auf zwei verschiedenen Proteinen lokalisiert sind (Du *et al.*, 2001; Du & Shen, 2001). Nach

zwei von NRPSs katalysierten Verlängerungsschritten wird das Intermediat innerhalb von MtaD wieder auf ein PKS-Modul übertragen. Man bezeichnet solche seltenen Proteine wie MtaD als NRPS/PKS-Hybride vom Typ II (Du *et al.*, 2001; Du & Shen, 2001). Meld (siehe unten), McyE, ein Protein der Microcystinbiosynthese (Tillett *et al.*, 2000), HMWP1, ein Protein der Yersiniabactinbiosynthese (Gehring *et al.*, 1998) und Ta1, das an der Bildung des Antibiotikums TA beteiligt ist (Paitan *et al.*, 1999), sind weitere Vertreter dieses Typs. Auf die Polyketidsynthasen MtaE und MtaF folgt mit MtaG wieder eine NRPS (siehe Abbildung 3.1). Am C-Terminus von MtaG befindet sich eine TE Domäne, die in der Regel das letzte Intermediat vom Protein abspaltet und so die nächste Runde der Biosynthese ermöglichen.

Das sukzessive Zusammenfügen der Bausteine erfolgt nach dem bei PKS und NRPS-Systemen häufig verwirklichten Prinzip der Colinearität, d.h. die lineare Anordnung der Module entspricht exakt der Abfolge der Elongationsschritte.

Am N-Terminus des Lademoduls bakterieller PKS vom Typ I befindet sich üblicherweise eine AT oder eine CoA-Ligase Domäne. Diese sind für die Erkennung – im Fall einer CoA-Ligase Domäne auch für die Aktivierung – der Startereinheit und deren Transfer auf die erste ACP Domäne verantwortlich (vergleiche hierzu die Erythromycinbiosynthese (Donadio *et al.*, 1991) und die Rifamycinbiosynthese (August *et al.*, 1998)). Der Vergleich verschiedener PKS Gencluster zeigt, dass als häufigste Startereinheiten Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Propionyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA verwendet werden. Wenn aktivierte Dicarbonsäuren benutzt werden, befinden sich am N-Terminus des Lademoduls modifizierte KS Domänen. Da das hochkonservierte Cystein im aktiven Zentrum dieser KS Domänen durch Glutamin (Q) oder Tyrosin (Y) ersetzt ist, werden sie auch als KS<sub>Q</sub>- bzw. KS<sub>Y</sub>-Domänen bezeichnet (Bisang *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Mutation haben sie die Fähigkeit verloren, Kondensationsreaktionen zu katalysieren. Stattdessen decarboxylieren sie präferentiell aktivierte Dicarbonsäuren, wobei die jeweilige Startereinheit entsteht (Bisang *et al.*, 1999). Die für die Biosynthesen von Epothilon (Julien *et al.*, 2000; Molnar *et al.*, 2000) und Niddamycin (Kakavas *et al.*, 1997) verantwortlichen Proteine enthalten beispielsweise solche modifizierten KS Domänen.

MtaB, das unter Verwendung der ungewöhnlichen Startereinheit 3-Methylbutyryl-CoA (Isovaleryl-CoA) die Myxothiazolbiosynthese initiiert, besitzt auch eine ungewöhnliche Domänenorganisation (ACP-KS-AT<sub>1</sub>-AT<sub>2</sub>-DH-S-KR-ACP; S: Spacer

Region, siehe 4.4.1). Es wurde vermutet, dass das ungewöhnliche Substrat die für PKSs untypische Proteinstruktur bedingt. So besitzen sowohl MxaF, das die Bildung der Myxalamide mit 2-Methylbutyryl-CoA oder Isobutyryl-CoA beginnt (Silakowski *et al.*, 2001), als auch SorA, welches für den Start der Soraphenbiosynthese Benzoyl-CoA als Substrat auswählt (Ligon *et al.*, 2002), die gleiche seltene Domänenorganisation wie MtaB. Der Einbau von Acetyl-CoA zu Beginn der Stigmatellinbiosynthese durch StiA (Gaitatzis *et al.*, 2002), das ebenfalls eine solche untypische Domänenanordnung besitzt, widerspricht allerdings dieser Vermutung. Typischerweise entstehen die myxobakteriellen Startereinheiten durch Degradation verzweigtkettiger Aminosäuren. Als Ausnahmen sind hier Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA zu nennen. Es konnte durch Inaktivierung der für den Aminosäureabbau verantwortlichen Gene gezeigt werden, dass in *S. aurantiaca* DW4/3-1 eine Route des Mevalonatweges existiert, die alternativ zum Aminosäureabbau die Bildung von 3-Methylbutyryl-CoA ermöglicht (Mahmud *et al.*, 2002).

Der ungewöhnliche Aufbau von MtaB wirft die Frage nach der "Kommunikation" zwischen den einzelnen Domänen auf. In der Modellvorstellung bilden bakterielle PKS vom Typ I Homodimere. Die beiden Untereinheiten bilden über eine Kopf-zu-Kopf- und Schwanz-zu-Schwanz-Assoziation eine doppelhelicale Struktur (für eine Übersicht siehe (Staunton & Weissman, 2001)). Die KS Domäne einer Untereinheit kommt so der ACP Domäne der gegenüberliegenden Untereinheit räumlich sehr nahe, was ein Weiterreichen der Intermediate über Kreuz vom N-Terminus her in Richtung des C-Terminus ermöglicht. Die optionalen Domänen bilden eine sogenannte reduktive Schleife, die als monomerer Abschnitt aus der doppelhelicalen Struktur herausragt. Wenn der Phosphopantetheinrest der N-terminalen ACP Domäne von MtaB bis zum aktiven Zentrum der AT<sub>1</sub> Domänen reichen soll, muss hier eine andere dreidimensionale Struktur als die oben beschriebene zugrunde liegen. Eine Kristallstruktur von MtaB könnte diese Frage klären, wobei die Kristallisation des 428,1 kDa großen Proteins sicherlich schwierig wäre.

Bei ihren Untersuchungen der Tandem-AT Domänen von SorA aus der Soraphenbiosynthese konnten Leadlay und Mitarbeiter zeigen, dass die AT<sub>1</sub> Domäne für die Beladung des Proteins mit der Startereinheit verantwortlich ist (Wilkinson *et al.*, 2001). Die AT<sub>2</sub> Domäne von SorA wählt hingegen die erste Verlängerungseinheit aus (Wilkinson *et al.*, 2001). In Kooperation mit P. Leadlay und C. Wilkinson konnte für das Myxothiazolsystem gezeigt werden, dass analog die AT<sub>2</sub> Domäne von MtaB



die ACP<sub>2</sub> Domäne mit der ersten Verlängerungseinheit (Malonyl-CoA) belädt. Eine Aktivierung von Isovaleryl-CoA durch die AT<sub>1</sub> Domäne von MtaB konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (RM, persönliche Mitteilung). Wahrscheinlich liegt in dem für die Expressionsversuche verwendeten Streptomyceten Isovaleryl-CoA in deutlich geringeren Konzentrationen als in *S. aurantia* DW4/3-1 vor. Es ist deshalb davon auszugehen, dass (in Analogie zur Soraphenbiosynthese) die AT<sub>1</sub> Domäne von MtaB die ACP<sub>1</sub> Domäne mit der Startereinheit belädt.

Durch die Katalyse der ersten KS Domäne entsteht ein Diketid, welches durch das letzte Modul von MtaB mit Methylmalonyl-CoA verlängert wird. Normalerweise führt die Wasserabspaltung aus  $\beta$ -Hydroxy-Intermediaten zu einer Doppelbindung, die zwischen den verknüpften Ketideinheiten liegt. Innerhalb des Triketides befinden sich die Doppelbindungen jedoch nicht wie erwartet in den Positionen  $\Delta^{7,9}$  sondern in den Positionen  $\Delta^{8,10}$ . Wann und ob es zur Umlagerung der Doppelbindungen kommt, ist unklar. Falls eine oder beide DH Domänen von MtaB Wasser nicht zwischen den verknüpften Biosynthesebausteinen abspalten, könnte das direkt zur ungewöhnlichen Struktur des Diens führen. Außerdem wurde zu Beginn der Arbeiten spekuliert, dass das am 3'-Ende des Genclusters gelegene Gen *mtaH*, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu Heptadienisomerasen zeigt, an der Umlagerung der Doppelbindungen beteiligt sein könnte (siehe 4.4.5).

Im nächsten Schritt der Biosynthese wird Cystein durch die A Domäne von MtaC aktiviert und durch dessen HC Domäne mit dem Polyketidintermediat von MtaB verknüpft. Dann katalysiert die bifunktionelle HC Domäne eine Zyklisierung mit anschließender Wasserabspaltung, wobei vermutlich ein Thiazolinring entsteht. Eine analoge Bildung von Thiazolinringen wurde von Walsh und Mitarbeitern bei ihren Untersuchungen zur Yersiniabactinbiosynthese diskutiert (Gehring *et al.*, 1998). Es ist noch unklar, ob die Oxidation zum Thiazol durch die am C-Terminus von MtaC gelegene Domäne erfolgt, die Ähnlichkeiten zu FMN-Bindeproteinen zeigt (siehe 4.5.2 und 4.5.3).

Das NRPS-Modul von MtaD ist für die Bildung des zweiten Thiazolrings verantwortlich. Dort ist die potentielle Ox Domäne in die A Domäne inseriert. Ähnliche Kandidaten für die Oxidation der wahrscheinlich intermediär auftretenden Thiazolinringe finden sich auch in der Bleomycin- und der Epothilombiosynthese (Du *et al.*, 2000; Julien *et al.*, 2000; Molnar *et al.*, 2000). Für die mögliche Ox Domäne in BlmIII aus der Bleomycinsynthetase von *Streptomyces verticillus*, welche wie die in

MtaC ebenfalls hinter dem PCP lokalisiert ist, konnte bisher der Nachweis der Funktionalität nicht erbracht werden (Du *et al.*, 2000). Die Cofaktorbindestelle in MtaD zeigt auf Proteinebene 38,9 % Identität zu der in EpoP, einer nichtribosomalen Peptidsynthetase aus der Epothilombiosynthese in *Sorangium cellulosum* So ce90 (Molnar *et al.*, 2000), welches auch als EpoB bezeichnet wird (Julien *et al.*, 2000). In EpoB ist die potentielle Ox Domäne an der gleichen Stelle der A Domäne inseriert wie in MtaD. Für die Ox Domäne von EpoB konnten Walsh und Mitarbeiter biochemisch nachweisen, dass sie für die Oxidation des Thiazolinheterozyklus verantwortlich ist (Chen *et al.*, 2001). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit und der gleichen Lokalisation im Protein, muss vermutet werden, dass zumindest die von MtaD katalysierte Bildung von Thiazolringen in der Gattung *Stigmatella* ganz analog verläuft. Während der Yersiniabactinbiosynthese katalysiert eine Cystein-spezifische A Domäne die Acylierung von drei PCPs, die sich auf zwei Proteinen befinden (Gehring *et al.*, 1998; Gehring *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wird die Bisthiazoleinheit des Myxothiazols von zwei vollständigen NRPS Modulen gebildet. Die wachsende Kette wird durch das PKS-Modul von MtaD um eine Malonyl-CoA- und von MtaE um eine Methylmalonyl-CoA-Einheit verlängert. Die Analyse der hochkonservierten Motive und die Ähnlichkeiten zu SAM-abhängigen Methyltransferasen zeigen, dass in MtaE zwischen der AT Domäne und der Spacer Region (siehe 4.4.1) eine potentielle O-MT Domäne integriert ist. Bis zur Sequenzierung des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters waren O-MTs nur als dekorierende Proteine – kodiert von separat gelegenen Genen – beschrieben worden. Es war das erste Beispiel, bei dem dieser Domänentyp in ein PKS-Modul inseriert ist. Aufgrund der Domänenorganisation von MtaE ist anzunehmen, dass das nach der Inkorporation von Methylmalonyl-CoA entstehende  $\beta$ -Ketointermediat zunächst zum sekundären Alkohol reduziert wird. Dieser wird dann von der O-MT Domäne in einer SAM-abhängigen Reaktion zum  $\beta$ -Methoxyintermediat umgesetzt. MtaF, das nächste Protein der Biosynthesemaschinerie, enthält ebenfalls eine Domäne mit Ähnlichkeiten zu SAM-abhängigen Methyltransferasen. Da MtaF im Gegensatz zu MtaE außer der potentiellen O-MT Domäne keine weitere optionale Domäne enthält, muss hier von einem anderen Ablauf der Methylierung ausgegangen werden. Die Vermutung liegt nahe, dass das an der ACP Domäne von MtaF befindliche  $\beta$ -Ketointermediat zum Enol tautomerisiert, welches dann methyliert wird. Dabei entsteht die für die biologische Wirksamkeit verantwortliche

$\beta$ -Methoxyacrylat-Teilstruktur. Ähnliche O-MT Domänen befinden sich auch in StiD und StiE, zwei Proteine aus der Stigmatellinbiosynthese (Gaitatzis *et al.*, 2002) und in MelE bzw. MelF, die an der Bildung von Melithiazol beteiligt sind (siehe Abbildung 4.5). Die phylogenetische Analyse dieser Domänen zeigt, dass MtaF ähnlicher zu MelF als zu MtaE ist. Hier spiegelt sich wieder, dass die O-MT Domänen von MtaF und MelF für die Methylierung der Enolform eines  $\beta$ -Ketointermediates verantwortlich sind. Die übrigen vier Domänen, die eine Methylierung im Polyketidintermediat nach erfolgter Ketoreduktion katalysieren, bilden im Dendrogramm ein separates Cluster.

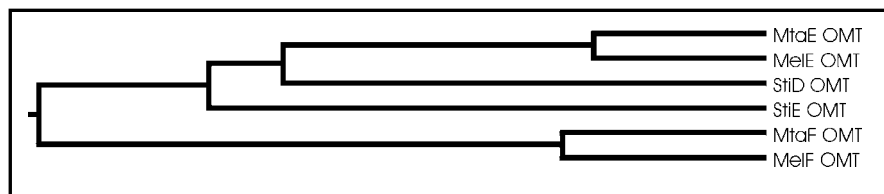


Abbildung 4.1 Phylogenetischer Vergleich der O-Methyltransferase Domänen (O-MT) des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters (MtaE/MtaF), des Melithiazol-Biosynthesegenclusters (MelE/MelF) und des Stigmatellin-Biosynthesegenclusters (StiD/StiE). Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe des Programms MegAlign nach der Clustal-Methode erstellt. Dabei wurden die Parameter gewählt, die das Programm standardmäßig vorschlägt.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren in der Literatur nur C-MT Domänen beschrieben worden, die in PKS Module integriert sind. Die Yersiniabactinbiosynthese in *Yersinia pestis* und die Lovastatinbiosynthese in *Aspergillus terreus* sind als Beispiele zu nennen (Gehring *et al.*, 1998; Gehring *et al.*, 1998; Hendrickson *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1999). Bei der Yersiniabactinsynthetase handelt es sich um ein NRPS/PKS-Hybrid, bei dem im High Molecular Weight Protein1 (HMWP1) die C-MT Domäne C-terminal von der AT Domäne lokalisiert ist (Gehring *et al.*, 1998). Bei der Lovastatin Nonaketid Synthase (LNKS) handelt es sich um eine pilzliche PKS vom Typ I, die nur aus einem einzigen Modul besteht, welches iterativ fungiert (Kennedy *et al.*, 1999). Hier befindet sich die C-MT Domäne zwischen einer DH Domäne und einer inaktiven ER Domäne. In der Lovastatin Diketid Synthase (LDKS) ist die C-MT Domäne zwischen der DH Domäne und einer funktionalen ER Domäne inseriert. Obwohl das Myxothiazol nun fast seine volle Länge erreicht hat, wurde stromabwärts von *mtaF* ein weiteres Gen identifiziert, das für die Biosynthese benötigt wird. Das von *mtaG* abgeleitete Protein zeigt unerwarteterweise Ähnlichkeiten zu NRPS. Dies führte zu der Annahme, dass MtaG eine zusätzliche Aminosäure an das am ACP von MtaF befindliche Intermediat anknüpft und so zur Bildung des Amides beiträgt. Zu

Beginn der Arbeiten war die Herkunft des Amidstickstoffes unbekannt. Durch Fütterungsexperimente mit  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren und  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ammoniumchlorid konnte unser Kooperationspartner T. Mahmud zeigen, dass Glycin die Stickstoffquelle darstellt (siehe 4.4.4).

Zur Entstehung von Säureamiden in Mikroorganismen war wenig bekannt. Durch Fütterung von  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren konnten Floss und Mitarbeiter zeigen, dass der Stickstoff des endständigen Amides von Nosiheptid mit großer Wahrscheinlichkeit aus Serin stammt (Mocek *et al.*, 1993). Das im Myxalamid enthaltene sekundäre Säureamid geht auf ein inkorporiertes Alanin zurück (Gerth *et al.*, 1983; Silakowski *et al.*, 2001). Die Bildung C-terminaler Amide in Peptidhormonen ist bei Säugetieren und Insekten ein gut untersuchter Prozess, der über die oxidative Spaltung von Glycin-verlängerten Prohormonen erfolgt (Kulathila *et al.*, 1999). Für diese posttranslationale Amidierung ist die bifunktionale Peptidylglycin  $\alpha$ -amidierende Monooxygenase (PAM) verantwortlich. Im ersten Schritt katalysiert die Peptidyl  $\alpha$ -hydroxylierende Monooxygenase (PHM) in einer sauerstoff-, kupfer- und ascorbatabhängigen Reaktion die  $\alpha$ -Hydroxylierung des Glycins (siehe Abbildung 4.2 A). Die Peptidylamidoglycolat Lyase (PAL) spaltet in einer zweiten zinkabhängigen Reaktion das Alkoholamid in Glyoxylat und das in  $\alpha$ -Position amidierte Peptid (Kulathila *et al.*, 1999). Die Bildung von Nicotinamid aus Nicotinursäure durch Peptidylglycin  $\alpha$ -amidierende Monooxygenase bei der Bildung von NADP aus Niacin (Nicotinsäure) ist ein weiteres Beispiel für diesen Reaktionsablauf (Merkler *et al.*, 1999). Obwohl PAM bzw. PHM/PAL für die Bildung terminaler Amide verantwortlich sind und für MtaG eine Beteiligung an der Entstehung einer solchen Teilstruktur wahrscheinlich ist, zeigten diese Proteine bei Datenbankvergleichen keine Sequenzhomologien zu MtaG. Zwischen den hochkonservierten Motiven A4 und A5 (Konz & Marahiel, 1999) der A Domäne von MtaG wurde jedoch über Sequenzvergleiche eine Domäne mit Ähnlichkeiten zu Flavin und  $\text{F}_{420}$ -abhängigen Monooxygenasen/Hydrogenasen identifiziert. Es wird vermutet, dass die Bildung des Amides im Myxothiazol über einen analogen Mechanismus verläuft (siehe Abbildung 4.2 B). Das Ergebnis der Fütterungsexperimente bestätigt diese Hypothese zur Bildung des Säureamides. Dabei würde die MOX Domäne das inkorporierte Glycin in  $\alpha$ -Position hydroxylieren. Ob das entstehende Alkoholamid spontan oder durch Katalyse der MOX Domäne

desalkyliert wird, ist unklar. Dann würde die TE Domäne von MtaG Glyoxylat von der PCP Domäne abspalten, so dass das Enzym regeneriert wird.

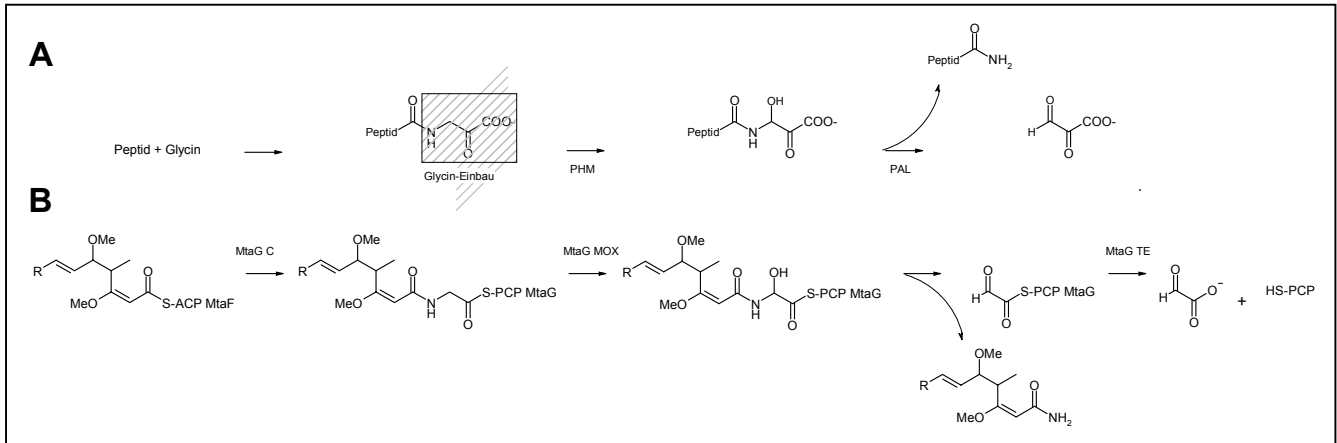


Abbildung 4.2 (A) Die Bildung amidierter Peptide in Insekten und Säugetieren (Kulathila *et al.*, 1999). (B) Die postulierte Entstehung des Säureamides im Myxothiazol. Es wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: ACP: Acyl Carrier Protein, C: Kondensationsdomäne, MOX: Monoxygenasedomäne, PCP: Peptidyl Carrier Protein, TE: Thioesterasedomäne.

Bei der Suche nach anderen Monooxygenasedomänen in NRPS/PKS-Hybriden, die möglicherweise an der Entstehung terminaler Amide beteiligt sein könnten, wurden in den Datenbanken zwei hypothetische Proteine mit integrierten MOX Domänen gefunden. Aus *Nostoc punctiforme* stammt ein Protein mit folgender Domänenorganisation: A-MOX-PCP-KS-AT-ACP-Aminotransferase-C-A-PCP-... . In der Sequenz von *Ralstonia solanacearum* lässt sich ein Protein mit der Abfolge ...-KS-AT-ACP-Aminotransferase-MOX-C-A-PCP-... identifizieren. Keines der beiden Proteine scheint an der Bildung eines endständigen Säureamides beteiligt zu sein, da die jeweiligen MOX Domänen nicht in C-terminale Module integriert sind. Dennoch handelt sich bei beiden Proteinen um PKS/NRPS-Hybride.

#### 4.3 Mutageneseverfahren zur Erzeugung von markerlosen Mutationen unter Erhalt des Leserahmens

Die Analyse von Biosynthesewegen, die für die Produktion von Polyketiden und nichtribosomal gebildeten Peptiden verantwortlich sind, erfolgt häufig durch gerichtete Mutagenesen. Dabei führen markerlose Deletionen, Insertionen oder

Punktmutationen innerhalb des entsprechenden Gens zur Bildung veränderter Proteine. Wenn deren Funktionalität erhalten bleibt, biosynthetisieren diese ein Derivat des ursprünglichen Sekundärmetaboliten. Die für die neuartigen Domänen postulierten Funktionen (Ox Domänen in MtaC und MtaD; O-MT Domänen in MtaE und MtaF; MOX Domäne in MtaG) sollten über den Nachweis entsprechender Myxothiazolderivate in den Mutanten bewiesen werden. Dazu wurde ein Protokoll zur Erzeugung markerloser Mutanten in *S. aurantiaca* DW4/3-1 über doppelte homologe Rekombination etabliert. Als Selektionsmarker nach der ersten homologen Rekombination diente Kanamycin. Zur Gegenselektion der zweiten homologen Rekombination wurde dabei das aus *Bacillus subtilis* stammende *sacB* Gen benutzt (Jager *et al.*, 1992). Aufgrund der langen Generationszeit von *S. aurantiaca* DW4/3-1 (ca. 6 h) und der daraus resultierenden langen Passagierzeiten dauern die Mutagenese-Experimente bis zu drei Monaten (Erzeugung von Transformanten 14 Tage, Anzucht und genotypische Analyse 14 Tage, Passage ohne Kanamycin 14 Tage, Erhalt von Einzelkolonien nach Anlegen einer Verdünnungsreihe 12 Tage, Anzucht und phänotypische Analyse 14 Tage, Anzucht und genotypische Analyse 14 Tage). Problematisch erwies sich die hohe Spontanresistenz gegen Saccharose. Nur 10-15% der Saccharose-resistenten Klone war in Folge einer zweiten homologen Rekombination auch wie erwartet Kanamycin-sensitiv. Um unter den Saccharose-resistenten Klonen neben Revertanten auch die gewünschten Mutanten identifizieren zu können, mussten deshalb nach der zweiten homologen Rekombination relativ viele Klone (100-120) phänotypisch analysiert werden. Kaiser und Mitarbeiter haben bei analogen Experimenten in *Myxococcus xanthus* eine bis zu hundertprozentige Effizienz erreichen können (Wu & Kaiser, 1996). Es wurde berichtet, dass die auf dem *galk* Gen beruhende Gegenselektion in *Myxococcus xanthus* einfacher durchzuführen ist (Ueki *et al.*, 1996). Versuche, diesen Selektionsmarker für die Gattung *Stigmatella* zu adaptieren, scheiterten (Maren Kopp, persönliche Mitteilung). Alle durchgeführten Mutagenesen wurden durch Southern Blot Analyse und Sequenzierung des veränderten Genabschnittes verifiziert. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % (bei gleicher Größe der PCR-Amplifikate I + II, siehe Abbildung 3.14) entsteht aus den merodiploiden Mutanten bei der zweiten homologen Rekombination wieder der Wildtyp. In jeder der durchgeführten Mutagenesen wurden dementsprechend Revertanten erhalten. Da diese alle wieder

Myxothiazol produzierten, können durch das Mutageneseverfahren hervorgerufene negative Effekte auf die Biosynthesemaschinerie ausgeschlossen werden.

#### **4.4 Mutagenesen im Myxothiazol-Biosynthesegencluster**

##### **4.4.1 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten ER Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB**

Im Hinblick auf den Reduktionsgrad der Triketidseitenkette schien die mögliche ER Domäne im ersten Modul von MtaB unnötig. Aus diesem Grund wurde über eine Beteiligung dieser Domäne an der Oxidation der Heterozyklen oder der Umlagerung der Doppelbindungen innerhalb der Nonadienylseitenkette spekuliert. Um ihre Funktion zu untersuchen, wurden innerhalb der abgewandelten NADPH-Bindestelle vier Aminosäuren ausgetauscht, was zu einem Nullproduzenten führte. Das Ergebnis zeigt, dass die mögliche ER Domäne unverzichtbar für die Myxothiazolbiosynthese ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die in dieser Domäne erzeugten Substitutionen zu einer Strukturveränderung und damit zu einer Inaktivierung von MtaB führen.

Nachdem weitere Gencluster aus Myxobakterien kloniert und sequenziert worden waren, zeigte sich, dass in deren PKS-Modulen zwischen der DH Domäne und der KR Domäne ebenfalls Domänen mit abgewandelten NADPH-Bindestellen inseriert sind (Silakowski *et al.*, 2001). Es handelt sich dabei um sogenannte Spacer Regionen, wie sie auch für fast alle PKSs und Fettsäuresynthasen beschrieben worden sind (Cane, 1997; Smith, 1994). Es wird angenommen, dass sie weniger eine katalytische, als vielmehr eine strukturelle Funktion erfüllen, indem sie die Proteindimere stabilisieren. Die myxobakteriellen Spacer Regionen sind bei einer Länge von 200-300 Aminosäuren untereinander bis zu 35 % identisch und zeigen hohe Ähnlichkeiten zu funktionalen ER Domänen (bis zu 20 % Identität). Das hochkonservierte Motiv LxHxxxGGVGxxAxxxA, wie es von (Kakavas *et al.*, 1997) für aktive ER Domänen beschrieben wurde, ist jedoch in allen Primärsequenzen deutlich abgewandelt (siehe Abbildung 4.3).

Folglich handelt es sich bei der vermuteten ER Domäne um eine Spacer Region, die nicht mutiert werden kann.

Konsensusmotiv einer  
funktionalen ER Domäne

LxHxxxGGVGxxAxxxA

MtaB Spacer1	SGA-----SQAGPEAWLLLLADRGGLAARLAEQLSSRGSRVEVLAAEE---
MtaB Spacer2	A-P-----AVPERGPWLLVADRGPAGEELAARLKREGQVCHVLAAPE---
MtaD Spacer	SGILEDVAVLEGT----WWVLADSAGVGTRLVEALQSHGARCVVVRPGPAYE
MtaE Spacer	AP-RSEAQSQGADTGKWLVLADGRGLGDALATRLREQGAPCTVLRAGG--E
MelD Spacer	DAG-TEAVLEGT----WLVLADATGTGDALVRSIRGRGVRCVVARPGAAYA
MeLE Spacer	GPGQREASRTSAASSAWLILSDRSVGVGQALAERLRAKGEPCCTLHANE--E

Abbildung 4.3 Sequenzvergleich der Spacer Regionen. Dargestellt sind nur die Sequenzabschnitte, die die abgewandelte NADPH-Bindestelle enthalten. Die aus der Melithiazolbiosynthese stammenden Spacer Regionen sind mit abgebildet. Die Aminosäuren, die vom hochkonservierten Motiv funktionaler ER Domänen abweichen, sind grau unterlegt.

#### 4.4.2 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der KR Domäne des ersten Verlängerungsmoduls von MtaB

In der NADPH-Bindestelle der KR Domäne des ersten Extensionsmoduls von MtaB wurden Punktmutationen eingeführt, um eine Mutante zu erzeugen, die statt Myxothiazol das entsprechende 10-Ketoderivat produziert (siehe Abbildung 3.19). Insgesamt drei Aminosäuren wurden innerhalb der NADPH-Bindestelle ausgetauscht, wobei der erste Austausch eine Aminosäure betrifft, die nicht zum hochkonservierten Motiv zählt.

Die resultierende Mutante war ein Null-Produzent, in deren Extrakt weder das erwartete 10-Ketoderivat noch sonstige Myxothiazolderivate detektiert werden konnten. Aus diesem Befund muss geschlossen werden, dass die KR Domäne essentiell für die Myxothiazolbiosynthese ist. Wahrscheinlich wird das veränderte Intermediat von der Biosynthesemaschinerie nicht weiterprozessiert. Ein analoges Experiment wurde mit der 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase (DEBS) 3, einem Protein aus der Erythromycinbiosynthese in *Saccharopolyspora erythraea*, erfolgreich durchgeführt (Donadio *et al.*, 1991). Hier wurde die gesamte KR Domäne in Modul 5 unter Erhalt des Leserahmens deletiert. Die erhaltene Mutante produzierte das erwartete Erythromycinderivat mit der Ketogruppe anstelle einer Hydroxylgruppe an der vorhergesagten Stelle. Offensichtlich wird in diesem System das veränderte Intermediat von dem nachfolgenden Modul 6 als Substrat akzeptiert. Auch für Myxobakterien ist die Erzeugung veränderter Komponenten durch gerichtete Mutagenesen innerhalb der reduktiven Schleife bereits beschrieben worden. So konnten Katz und Mitarbeiter durch die heterologe Expression einer mutagenisierten



Epothilonsynthetase in *Myxococcus xanthus* ein neues zytotoxisches Epothilonderivat erzeugen (Arslanian *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde die ER Domäne von Modul 5 durch den Austausch von zwei Aminosäuren innerhalb der NADPH-Bindestelle inaktiviert. Die konstruierte Biosynthesemaschinerie blieb funktionsfähig und produzierte 10,11-Didehydroepothilon D. Möglicherweise sind die Proteine der Epothilombiosynthese in ihrer Substratspezifität toleranter als diejenigen der Myxothiazolbiosynthese. Diese Hypothese wird untermauert durch Daten einer von Höfle und Mitarbeitern durchgeführte Studie, bei der im Kulturextrakt von *Sorangium cellulosum* über 30 verschiedene Epothilonderivate identifiziert werden konnten (Hardt *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnten nach der Fermentation von *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 im 100 l Maßstab nur wenige Myxothiazolderivate gefunden werden, die jedoch auf einen intrazellulären Abbau oder Isolierungsartefakte hinweisen (Gerd Höfle, persönliche Mitteilung).

Es ist auch hier nicht auszuschließen, dass die Mutationen innerhalb der KR Domäne zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur von MtaB führen, die dessen Inaktivierung verursacht. Da bisher noch keine kompletten PKS oder NRPS Megasyntetasen kristallisiert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten, kann über die Auswirkung der Mutagenese auf die Konformation des betroffenen Proteins nur spekuliert werden. Dies wird sich ändern, sobald strukturelle Daten kompletter PKS bzw. NRPS Megasyntetasen verfügbar sind.

#### **4.4.3 Erzeugung einer Punktmutation innerhalb der vermuteten O-Methyltransferase Domänen von MtaE und MtaF**

In den PKS Modulen von MtaE und MtaF wurden durch Sequenzvergleiche Domänen mit Ähnlichkeiten zu SAM-abhängigen Methyltransferasen gefunden. Um die Bedeutung dieses in PKSs neuen Domänentyps für die Myxothiazolbiosynthese zu untersuchen, wurden innerhalb der SAM-Bindestellen Punktmutationen erzeugt. Es wurde erwartet, dass die *mtaE*-Mutante mit veränderter O-MT Domäne ein 18-Desmethylderivat des Myxothiazols bildet. Analog wurde im Extrakt der *mtaF*-Mutante mit veränderter O-MT Domäne nach einem 20-Desmethylderivat gesucht. In beiden Fällen wurden nach der zweiten homologen Rekombination Null-Produzenten erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden SAM-Bindestellen absolut notwendig für die Myxothiazolbiosynthese sind. Möglicherweise akzeptieren die

nachfolgenden Domänen in den Mutanten die veränderten Intermediate nicht als Substrat. In der *mtaE*-Mutante wird MtaF statt des  $\beta$ -Methoxy-Intermediates der entsprechende sekundäre Alkohol als Substrat angeboten. In der *mtaF*-Mutante stellt statt des  $\beta$ -Methoxyacrylates ein  $\beta$ -Ketointermediat das Substrat für MtaG dar.

Wenn das an die ACP Domänen von MtaF gebundene veränderte Intermediat nicht weiterprozessiert wird, könnte es durch spontane oder auch enzymatische Hydrolyse abgespalten werden. Im Fall der *mtaF* Mutagenese könnte aus der entsprechenden  $\beta$ -Ketosäure durch Decarboxylierung ein Methylketon entstehen (siehe Abbildung 3.33). Weder diese Substanz noch Komponenten mit einem dem Myxothiazol-ähnlichen UV-Spektrum konnten in den Extrakten der Mutanten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten bei Untersuchungen der Rifamycinbiosynthese in *Amycolatopsis mediterranei* nach Inaktivierung von *rifF*, dessen Genprodukt die Lactambildung katalysiert, nahezu alle erwarteten Intermediate der Biosynthese identifiziert werden (Yu *et al.*, 1999).

Ein weiterer Grund, weshalb in *S. aurantiaca* DW4/3-1 keine Myxothiazolderivate produziert werden, könnte sein, dass diesem Organismus eine Thioesterase des Typ II (TEII) fehlt. Diese Enzyme scheinen fehlbeladene Substrate, die von den folgenden C oder KS Domänen nicht weiterprozessiert werden, von den betroffenen Carrier Protein Domänen abzuspalten (Doi-Katayama *et al.*, 2000; Schneider & Marahiel, 1998). TEII werden von separat gelegenen Genen kodiert, die in der Nachbarschaft zahlreicher Sekundärstoffgencluster identifiziert wurden. Beispiele hierfür sind das Pikromycin- (Xue *et al.*, 1998) und das Tylosin-Biosynthesegencluster (Butler *et al.*, 1999). In den 36 kbp stromabwärts des *mta* Genclusters konnte kein ORF mit Ähnlichkeiten zu Thioesterasen des Typs II gefunden werden.

Falls die veränderten Intermediate weder von der Myxothiazolsynthetase weiterprozessiert noch durch "Reinigungsenzyme" freigesetzt werden, war es denkbar, diese durch Insertion der TE Domäne hinter der Carrier Protein Domäne des mutagenisierten Moduls vom Protein abzuspalten. In NRPS- und PKS-Systemen wurden bereits TE Domänen mit verschiedenen internen Modulen fusioniert, was zur Abspaltung verkürzter Intermediate führte (Cortes *et al.*, 1995; de Ferra *et al.*, 1997). Sowohl in der *mtaE*- als auch in der *mtaF*-Mutante (und allen übrigen der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutanten) wurde die TE Domäne aus MtaG hinter der Carrier Protein Domäne des veränderten Moduls inseriert. Die Extrakte dieser Mutanten wurden mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie

analysiert. Es konnte keines der erwarteten veränderten Produkte nachgewiesen werden (T. Mahmud, RM persönliche Mitteilung).

Es kann in beiden Mutagenesen nicht ausgeschlossen werden, dass die Aminosäuresubstitutionen Konformationsänderungen von MtaE bzw. MtaF verursachen, die zur Inaktivierung führen. Die nach der zweiten homologen Rekombination erhaltenen Revertanten verifizieren die Mutagenese, da diese wieder Myxothiazol produzieren.

Sollten das 18- und das 20-Desmethylderivat des Myxothiazols als Substrate synthetisiert und die O-MT Domänen von MtaE und MtaF als separate Proteine exprimiert werden können, besteht die Möglichkeit, die postulierte Funktion der O-MT Domänen biochemisch zu beweisen.

Ein neueres Beispiel, bei dem durch Mutationen Desmethylderivate eines Antibiotikums erzeugt werden konnten, stammt von Heide und Mitarbeitern. Bei ihren Studien konnten die Autoren in *Streptomyces rishiriensis* durch Geninaktivierungen neue desmethylierte Derivate des Coumermycin erzeugen (Li *et al.*, 2002). Bei CouO handelt es sich um eine C-MT, die für die Methylierung der Aminocoumarinringe in Position 8 nötig ist. CouP methyliert die in Position 4 befindliche Hydroxylgruppe der beiden Desoxyzucker. Die entsprechenden Methyltransferasen sind als "dekorierende Enzyme" anzusehen, die von separaten Genen kodiert werden. Es wird also zunächst das Grundgerüst biosynthetisiert, das abschließend methyliert wird. Hierin besteht der Unterschied zu den potentiellen O-MT Domänen aus MtaE und MtaF, die während der Polyketidbiosynthese aktiv sind, so dass das methylierte Produkt auch Intermediat ist. Folglich müssen bei deren Mutation die nachfolgenden Domänen das veränderte Intermediat weiterprozessieren, wenn ein Desmethylderivat erhalten werden soll.

#### 4.4.4 Deletion der MOX Domäne in MtaG

In Säugetieren und Insekten ist Glycin an der Amidierung zahlreicher Peptidhormone beteiligt (Kulathila *et al.*, 1999). Im Nosiheptid geht das terminale Amid wahrscheinlich auf ein inkorporiertes Serin zurück (Mocek *et al.*, 1993). In der Myxalamidbiosynthese ist Alanin an der Bildung des sekundären Säureamides beteiligt (Gerth *et al.*, 1983; Silakowski *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Befunde wurde in der *mtaG*ΔMOX<sub>2284-3324</sub>-Mutante ESW331 nach Myxothiazoladdukten mit den

entsprechenden Aminosäuren gesucht. Die erzeugte Mutante erwies sich als Nullproduzent, in deren Extrakt keine der erwarteten Substanzen identifiziert werden konnte.

Der Spezifitätscode für Adenylierungsdomänen (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999) wies auf Glycin als Substrat der Adenylierungsdomäne von MtaG hin. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden in Kooperation mit T. Mahmud Fütterungsversuche mit  $^{15}\text{N}$  markierten Aminosäuren und  $^{15}\text{N}$  markiertem Ammoniumchlorid durchgeführt.  $^{15}\text{N}$  Glycin wurde mit einer Einbaurate von 40,6 % in Myxothiazol inkorporiert, während markiertes Glutamat bzw. Ammoniumchlorid nicht inkorporiert wurde. Somit war gezeigt, dass der Stickstoff des endständigen Amides aus Glycin stammt, das wahrscheinlich intermediär mit dem Molekül verknüpft ist.

Um den Ablauf der Säureamidbildung näher zu untersuchen ist geplant, die MOX Domäne als eigenständiges Protein heterolog zu exprimieren und zu reinigen. Als Substrat für den Aktivitätstest muss das um eine vollständige Glycin-Einheit verlängerte Myxothiazolderivat als N-Acetyl-Cysteamin-Thioester synthetisiert werden. Bei einem solchen Substrat imitiert der N-Acetyl-Cysteamin-Rest den Phosphopantetheinarm der Carrier Protein Domäne. Möglicherweise könnte neben Myxothiazol auch das in  $\alpha$ -Position des Glycins hydroxylierte Intermediat nachgewiesen werden. Um auch die Bildung der Glyoxylsäure zu zeigen, würde sich eine Markierung des Glycinrestes mit  $^{13}\text{C}$  oder Deuterium anbieten. In diesem Assay könnten zusätzlich potentielle Cofaktoren von MtaG getestet werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um FMN (siehe nächster Abschnitt), doch ein experimenteller Nachweis steht noch aus.

In Strukturdatenbankvergleichen zeigt MtaG Ähnlichkeiten zu bakteriellen Luciferasen (siehe Abbildung 4.4). Diese Monooxygenasen sind üblicherweise FMN-abhängig (Fisher *et al.*, 1996). Sie katalysieren die Oxidation eines langkettigen Aldehyds, wobei Energie in Form von sichtbarem Licht freigesetzt wird (Biolumineszenz).



Die in Strukturdatenbanken hinterlegten Proteine wurden ohne den Cofaktor (also in der Apoform) kristallisiert, weshalb eine exakte Definition der FMN-Bindestelle bisher nicht möglich ist. Für die Art der FMN Bindung werden alternative Modelle diskutiert (Lin *et al.*, 2001; Tanner *et al.*, 1997).

Deshalb kann aufgrund der Homologien von MtaG zu bakteriellen Luciferasen nur darüber spekuliert werden, dass MtaG ebenfalls FMN-abhängig ist.

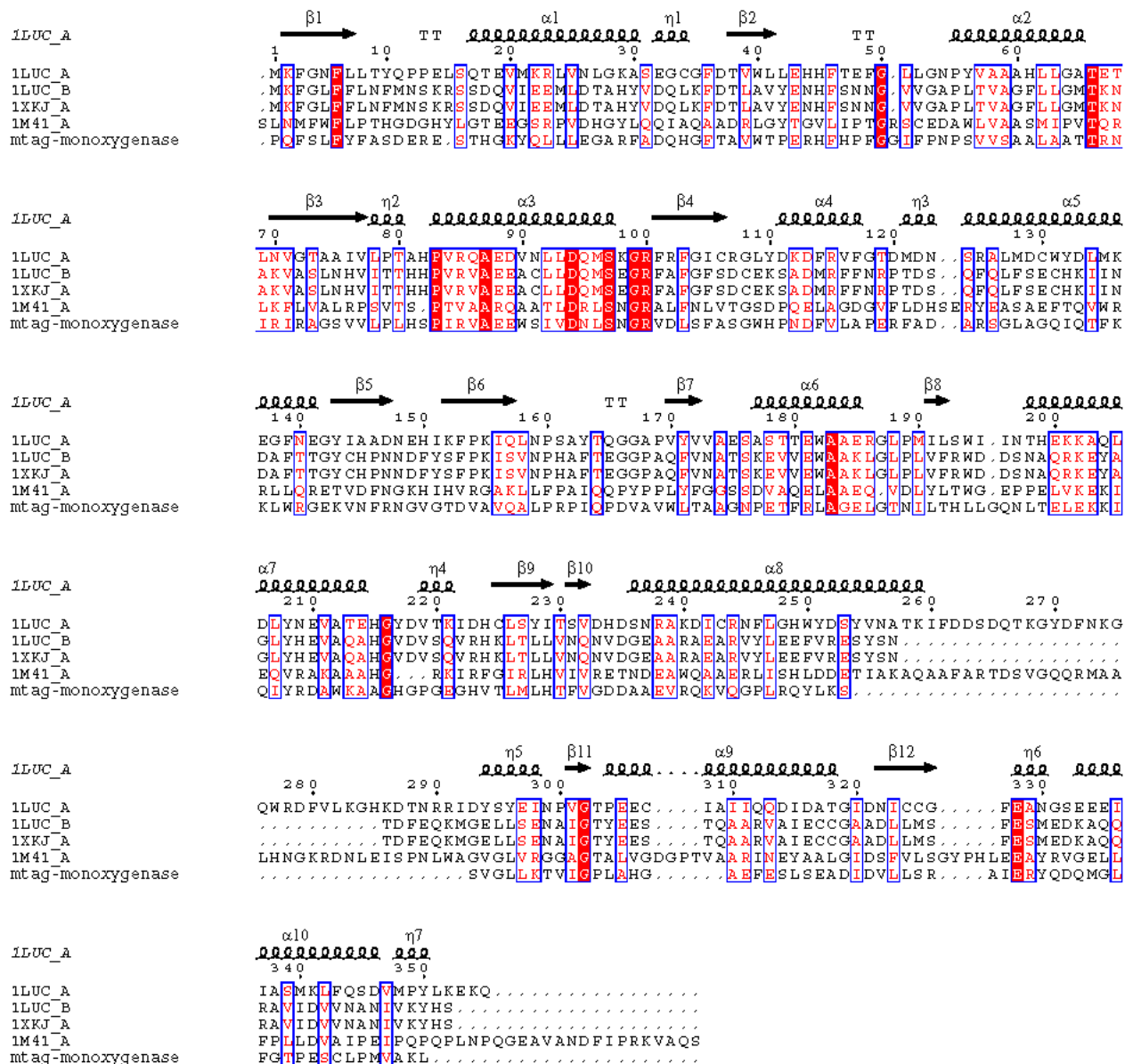


Abbildung 4.4 Sequenzvergleich von MtaG mit bakteriellen Luciferasen. Die mit einer blauen Box markierten Bereiche sind konserviert. Absolut konservierte Reste wurden mit weißer Schrift auf rotem Hintergrund abgebildet. Konservativ substituierte Aminosäuren sind auf weißem Hintergrund mit roter Schrift dargestellt. Bereiche mit β-Faltblattstruktur sind mit schwarzen Pfeilen, α-helicale Abschnitte mit Schlangenlinien markiert.

#### 4.4.4.1 Die MOX Domäne von MtaG katalysiert einen alternativen Kettenfreisetzung-Mechanismus

Nach dem letzten Verlängerungsschritt werden Polyketide und Hybride aus Polyketiden und nichtribosomal gebildeten Polypeptiden durch Thioesterase Domänen vom Protein abgespalten. TE Domänen übertragen durch einen nukleophilen Angriff das an die letzte Carrier Protein Domäne gebundene Intermediat auf einen hochkonservierten Serinrest. Für die Abspaltung von der TE Domäne ergeben sich zwei Möglichkeiten. Bei der intermolekularen Hydrolyse entsteht die freie Säure (vergleiche  $\delta$ (L- $\alpha$ -Amino $\alpha$ dipyl)-L-cysteiny-D-Valin (ACV), einem Zwischenprodukt der Ampicillinbiosynthese (Byford *et al.*, 1997)). Im Gegensatz dazu führt der intramolekulare Angriff eines Nukleophils zur Makrolactonisierung mit anschließender Freisetzung (z.B. Erythromycin). Fungiert ein in der Kette enthaltenes Amin als Nukleophil, so resultiert daraus die Bildung eines Lactams (z.B. Bacitracin, Cyclosporin). Ein Beispiel für eine Kettenabspaltung ohne die Beteiligung einer TE Domäne findet man in der Rifamycinbiosynthese. Hier katalysiert eine separate Amidsynthase (RifF) die intramolekulare Lactambildung gefolgt von der Freisetzung des Produktes (Yu *et al.*, 1999). Das Myxochelin- (Gaitatzis *et al.*, 2001) und das Myxalamid-Biosynthesegencluster (Silakowski *et al.*, 2001) enthalten ebenfalls keine TE Domänen. Dort wird das am letzten Modul befindliche Intermediat reduktiv abgespalten, wobei vermutlich ein Aldehyd entsteht. Dieser wird dann zum Alkohol reduziert. Im Falle von Myxochelin kann der Aldehyd auch alternativ zum Amin umgesetzt werden. Die in MtaG enthaltene MOX Domäne erweitert das Spektrum der Kettenfreisetzungsmechanismen. So wird im Falle des Myxothiazols von diesem neuen Domänentyp statt eines makrocyclischen Lactams ein lineares Säureamid abgespalten. Die am N-Terminus von MtaG gelegene TE Domäne scheint lediglich notwendig, um durch die Hydrolyse von Glyoxylat die freie PCP Domäne zu regenerieren.

#### 4.4.5 Untersuchungen zur irregulären Lage der Doppelbindungen

MtaH zeigt im Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu bifunktionalen Decarboxylase/Isomerasen. In *E.coli* sind diese Heptadienisomerasen, welche die Umlagerung von Doppelbindungen katalysieren, am Abbau von 3,4-Dihydroxyphenylacetat, einem Produkt des Tyrosin- und Phenylalaninmetabolismus beteiligt (Roper & Cooper, 1993; Tame *et al.*, 2002). Der für diese Reaktion diskutierte Ablauf der Isomerisierung ist nicht zwanglos auf die Nonadienylseitenkette des Myxothiazols

übertragbar. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass MtaH für die irreguläre Lage der Doppelbindungen innerhalb der Triketidseitenkette des Myxothiazols verantwortlich ist. Durch Inaktivierung von *mtaH* hätte deshalb eine Mutante entstehen können, die ein Myxothiazolderivat mit regulärer Lage der Doppelbindungen produziert (siehe Abbildung 3.36). Aus den Extrakten von ESW200 und ESW444 wurde Myxothiazol isoliert und einer  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse unterzogen. Es konnte in beiden Fällen kein Unterschied zum Referenzspektrum des Myxothiazols nachgewiesen werden. Auch die Inaktivierung eines potentiellen Isogens von *mtaH*, das *mtaX* genannt wurde, führte zu keiner Mutante, die ein verändertes Myxothiazol produzierte. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Beteiligung von MtaH an der Myxothiazolbiosynthese auszuschließen, obwohl *mtaH* lediglich 15 bp stromabwärts von *mtaG* lokalisiert ist und beide Gene in die gleiche Richtung transkribiert werden. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass das Melithiazol-Biosynthesegencluster mit *melH* ein zu *mtaH* homologes Gen enthält (siehe Tabelle 3.9). Dessen Bedeutung für die Melithiazolbiosynthese ist ebenfalls unklar (siehe 4.6).

Es ist denkbar, die Umlagerung der Doppelbindungen innerhalb des Triketides biochemisch zu untersuchen. Dazu müsste MtaC heterolog exprimiert und gereinigt werden. Als Substrat müsste das am dritten ACP von MtaB vermutete  $\text{C}_{10}$ -Intermediat (mit "regulärer" und "irregulärer" Lage der Doppelbindungen) als N-Acetyl-Cysteamin Derivat synthetisiert werden. Außer diesen Substraten sollten dem Aktivitätstest Cystein und FMN zugesetzt werden. Sollte nur eines der beiden  $\text{C}_{10}$ -Intermediate im Assay von MtaC um einen Thiazol(in)ring verlängert werden, ließe dies Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Umlagerung der Doppelbindungen zu. Doppelbindungen mit einer für Polyketide ungewöhnlichen Lage befinden sich auch im Ansamitocin (Asai *et al.*, 1979; Higashide *et al.*, 1977). In der DNA-Sequenz des Ansamitocin-Biosynthesegenclusters aus *Actinosynnema pretiosum* ergibt sich kein Hinweis auf die Entstehung dieser Teilstruktur (Yu *et al.*, 2002). Im Soraphen befindet sich auch eine Doppelbindung in irregulärer Position (Ligon *et al.*, 2002). Aufgrund der Domänenorganisation des zugehörigen Moduls muss hier von der Reduktion zum Alkan und einer anschließenden PKS-unabhängigen Oxidation ausgegangen werden (Ligon *et al.*, 2002). Letzteres wurde durch Fütterungsexperimente bestätigt (Gerth *et al.*, 2003).

## 4.5 Untersuchungen zur Entstehung der Bisthiazoleinheit im Myxothiazol

### 4.5.1 Allgemeine Betrachtung der Heterozyklenbildung

Fünfgliedrige Heterozyklen wie Thiazol(in)e und Oxazol(in)e sind ein häufiges Strukturelement mikrobieller Sekundärmetabolite (für eine Übersicht siehe (Roy *et al.*, 1999)). Biosynthetisch gehen Oxazol(in)e auf den Einbau der Aminosäuren Serin oder Threonin zurück. Im Gegensatz dazu führt der Einbau von Cystein zu einem Thiazol(in) (siehe Abbildung 1.7). Diese sind sowohl in ribosomal als auch in nichtribosomal gebildeten Peptiden enthalten. Man findet solche Heterozyklen auch in Naturstoffen des gemischten PK/NRP Typs.

Das ribosomal gebildete Peptid Microcin B17 enthält vier Thiazol- und vier Oxazolringe. Diese werden von einem Biosynthesekomplex, der aus den Proteinen McbB, McbC und McbD besteht, posttranslational gebildet (Li *et al.*, 1996). Obwohl man von einem ähnlich Ablauf des Ringschlusses ausgehen kann, zeigen HC Domänen aus NRPSs keine Sequenzähnlichkeiten zu den Proteinen des Microcinbiosynthesekomplexes (Konz *et al.*, 1997).

Bei der Heterozyklenbildung durch NRPSs und PKS/NRPS-Hybride entstehen als Zwischenstufen zunächst Thiazoline nach der Inkorporation von Cystein (Gehring *et al.*, 1998) bzw. Oxazoline nach der Inkorporation von Serin oder Threonin (Roy *et al.*, 1999). Diese Dihydroheterozyklen können von nachfolgenden Modulen verlängert, reduziert oder oxidiert werden. Während die Reduktion ein NADPH-abhängiger Prozess ist, wird für die Oxidation FMN als Cofaktor benötigt. Die Reduktion vom Thiazolin zum Thiazolidin wird in der Yersiniabactinbiosynthese von YbtU (Miller *et al.*, 2002) und in der Pyochelinbiosynthese von PchG (Patel & Walsh, 2001) bewerkstelligt. In beiden Fällen handelt es sich um separate Proteine, die *in trans* wirksam sind. Walsh und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der im Epothilon enthaltene Thiazolring in einer FMN abhängigen Oxidation aus einem Thiazolinintermediat hervorgeht (Chen *et al.*, 2001). Die entsprechende Ox Domäne ist in EpoB integriert und somit *in cis* wirksam. Bei der Oxidation des Thiazolins zum Thiazol geht FMN in seine reduzierte Form, das FMNH<sub>2</sub> über. Es ist unklar, wie dessen Reoxidation *in vivo* vonstatten geht. *In vitro* könnte jedoch O<sub>2</sub> diese Funktion übernehmen.



Die Oxidation vom Thiazolin zum Thiazol zeigt Analogien zu der Umsetzung von Dihydroorotat zu Orotat, wie sie bei der Pyrimidinbiosynthese beobachtet wird (Pascal & Walsh, 1984). Sie ist außerdem analog zu den Reaktionen der FAD abhängigen Acyl-CoA Dehydrogenase, bei denen durch Hydrid-Transfer Enoyl-CoA Ester entstehen (Ghisla *et al.*, 1984).

Eine Variante der Thiazolbildung findet man im Verlauf der Barbamidbiosynthese (Chang *et al.*, 2002). Dort wird Cystein von der HC Domäne eines PKS/NRPS-Hybridsystems als letzter biogenetischer Baustein inkorporiert. Die C-terminal gelegene TE Domäne spaltet daraufhin das fast fertige Barbamid als Thiazolinyldicarboxylat ab. Die Autoren postulieren dann eine oxidative Decarboxylierung durch die der Kohlenstoff der Carboxylgruppe verloren geht und der Thiazolring des Barbamides entsteht.

#### **4.5.2 Deletion der Oxidationsdomänen von MtaC und MtaD**

Hinter der PCP Domäne von MtaC und inseriert in die A Domäne von MtaD befinden sich Domänen mit Ähnlichkeiten zu FMN-bindenden Proteinen. Um die Funktion dieser potentiellen Oxidationsdomänen bei der Entstehung der Thiazolringe zu untersuchen, wurden die entsprechenden Genabschnitte unter Erhalt des Leserahmens deletiert. Die durch Deletion der Oxidationsdomäne von MtaC erhaltene Mutante produzierte wie der Wildtyp Myxothiazol. Das erwartete Thiazolin-Thiazol-Derivat konnte nicht identifiziert werden. Demnach ist diese Domäne für die Myxothiazolbiosynthese verzichtbar.

Wahrscheinlich komplementiert in der Mutante die Ox Domäne von MtaD die Funktion der deletierten Domäne. Da die heterolog exprimierte und aufgereinigte Ox Domäne von MtaC im Aktivitätstest das Thiazolin-Thiazol-System im Melithiazol nicht zum Bisthiazol oxidiert (siehe 4.5.3), liegt die Vermutung nahe, dass diese Domäne inaktiv ist. Somit ist auch denkbar, dass die Ox Domäne von MtaD im Wildtypen für die Oxidation beider Thiazoline verantwortlich ist.

Da die Biosynthesemaschinerie trotz dieser Deletion noch funktioniert, ist gezeigt, dass markerlose Mutationen unter Erhalt des Leserahmens nicht zwangsläufig zu einem Nullproduzenten führen müssen. Es ist allerdings verwunderlich, dass das Erzeugen einer Punktmutation (siehe 3.8 und 3.9) die gesamte Biosynthese blockiert, der Verlust etwa 600 bp Sequenzinformation aber keinen Einfluss auf die Produktivität des Systems hat.

Für PKSs sind in der Literatur sogenannte Interpolypeptid-Linker beschrieben worden (Gokhale & Khosla, 2000). Über diese lagern sich die multifunktionellen Proteine zu einem Komplex zusammen, was die Voraussetzung für das gerichtete Weiterreichen von Intermediaten von einem Protein zum nächsten ist. Zu Beginn der Arbeiten war anzunehmen, dass in NRPSs vergleichbare Interpolypeptid-Linker existieren. Die Deletion der Ox Domäne von MtaC wurde deshalb so durchgeführt, dass die 18 Aminosäuren vom C-Terminus erhalten blieben. Offensichtlich ist dieser Proteinabschnitt groß genug, um als C-terminaler Linker zu fungieren und so die Assoziation mit dem N-terminalen Linker von MtaD zu ermöglichen. Dass die Produktivität der veränderten Myxothiazolsynthetase erhalten bleibt, ist somit ein deutlicher Hinweis auf das Vorkommen von Interpolypeptid-Linkern in NRPSs.

Die Deletion der Oxidationsdomäne von MtaD, die in die A Domänen inseriert ist, führte zu einem Nullproduzenten. Weder das erwartete Thiazol-Thiazolin noch ein Bisthiazolin konnten detektiert werden. Die Ox Domäne von MtaD ist demnach im Gegensatz zu der Ox Domäne von MtaC unverzichtbar für die Myxothiazolbiosynthese. Möglicherweise prozessiert das PKS Modul von MtaD aufgrund seiner hohen Substratspezifität das veränderte Intermediat nicht weiter. Eine durch die Deletion verursachte Strukturveränderung von MtaD ist auch hier nicht auszuschließen. Die aus den merodiploiden Mutanten hervorgegangenen Revertanten produzieren alle Myxothiazol und verifizieren somit diese Mutagenese. Mit den erhaltenen Ergebnissen konnten die postulierten Funktionen der Oxidationsdomänen bei der Entstehung der Bisthiazoleinheit leider nicht eindeutig bewiesen werden. Es konnte aber zum ersten Mal eine überflüssige Domäne in einem NRPS Modul identifiziert werden.

#### **4.5.3 *In vitro* Experimente zur Entstehung der Bisthiazoleinheit**

Um die Funktion der potentiellen Ox Domänen von MtaC und MtaD zu untersuchen, sollten beide Domänen als eigenständige Proteine exprimiert werden. Die gereinigten Proteine sollten anschließend Aktivitätstests mit dem Thiazolin-Thiazol Melithiazol als Substrat unterzogen werden. Des weiteren sollte der biochemische Versuchsansatz Auskunft über die Natur des Cofaktors liefern.

Die Ox Domäne von MtaC konnte in *E. coli* in löslicher Form exprimiert und gereinigt werden. Die intensive Gelbfärbung des gereinigten Proteins war ein deutlicher

Hinweis auf FMN als gebundenem Cofaktor. Auch das UV-Spektrum des vom Protein abgespaltenen Cofaktors stimmt mit den Literaturdaten dahingehend überein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Entstehung des Thiazolringes im Epothilon, bei denen Walsh und Mitarbeiter ebenfalls FMN als Cofaktor von EpoB identifizieren konnten (Chen *et al.*, 2001). Im Aktivitätstest konnte unter den getesteten Bedingungen die Ox Domäne von MtaC das als Substrat angebotene Melithiazol nicht zum Bisthiazol oxidieren. Dies ließe sich möglicherweise mit einer im Vergleich zum nativen Protein veränderten räumlichen Struktur der separat exprimierten Domänen erklären. Für separat exprimierte A Domänen konnten hingegen schon gezeigt werden, dass sie auch als eigenständige Proteine aktiv sind (Mootz & Marahiel, 1997). Auch PCP Domänen konnten schon als separate Proteine exprimiert und posttranslational aktiviert werden (Gaitatzis *et al.*, 2001). Denkbar ist auch, dass die Ox Domäne das dem Myxothiazol sehr ähnliche Melithiazol nicht als alternatives Substrat akzeptiert. Der strukturelle Unterschied zwischen Myxothiazol und Melithiazol ist im "vorderen" Molekülteil deutlich (siehe Abbildung 1.9), allerdings ist dieser von der erwarteten Umsetzung nicht betroffen. Möglicherweise ist die Aktivität an das Vorliegen des Substrates in Form eines Thioesters (z.B. als N-Acetyl-Cysteamin Derivat) gebunden. Ein solches Substrat stand jedoch nicht zur Verfügung. Es ist nicht auszuschließen, dass die am C-Terminus der Domäne klonierungsbedingt angefügten Aminosäuren eine Inaktivierung verursachen. Da nach der Deletion des für diese Domäne kodierenden Genabschnittes von *mtaC* eine Mutante erhalten wird, die unverändert Myxothiazol produziert, ist diese Domäne für die Myxothiazolbiosynthese überflüssig. Zusammen mit dem Befund des *in vitro* Experimentes scheint es deshalb sehr wahrscheinlich, dass diese Domäne inaktiv ist.

Die Ox Domäne von MtaD konnte in nachweisbaren Mengen nicht löslich exprimiert werden. Bei der heterologen Expression von Genen in *E. coli* stellt sich häufig das Problem der Unlöslichkeit der exprimierten Proteine. Es kommt zur Bildung von sogenannten "Einschlusskörpern". Ob die Ox Domäne von MtaD in unlöslicher Form exprimiert wurde, ist nicht eindeutig zu sagen. Nach Variation der Kulturbedingungen (Temperatur und Medium) konnte sie jedoch nicht in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Der hohe GC-Gehalt myxobakterieller DNA kann eine Ursache dafür sein, dass das entsprechende Protein nicht oder nur in nicht nachweisbaren Mengen in *E. coli* exprimiert wird. Der Vergleich der

Codonverwendung innerhalb der Ox Domäne von MtaD und den von *E. coli* üblicherweise benutzten Codons (Neidhardt *et al.*, 1998) zeigt, dass in diesem Abschnitt Codons vorhanden sind, die *E. coli* selten oder gar nicht benutzt. Allerdings unterscheidet sich die Codonverwendung innerhalb der Ox Domänen von MtaD und MtaC nicht. Auch ist von der heterologen Expression ganzer myxobakterieller NRPS in *E. coli* berichtet worden (Gaitatzis *et al.*, 2001). Um die Ox Domäne von MtaD doch noch in ausreichenden Mengen in löslicher Form zu exprimieren, könnten andere Expressionssysteme getestet werden. Für den Aktivitätstest würde sich ein N-Acetyl-Cysteamin Derivat des Melithiazols als Substrat anbieten.

Da mit den Ergebnissen der *in vivo*- und *in vitro* Experimente die Entstehung der Bisthiazoleinheit des Myxothiazols nicht eindeutig geklärt werden konnte, sollte ein weiterer myxobakterieller Metabolit zu Hilfe gezogen werden. Das von *M. lichenicola* Me I46 produzierte Melithiazol ist dem Myxothiazol strukturell sehr ähnlich (siehe Abbildung 1.9), enthält jedoch ein Thiazolin-Thiazol-System. Da die Deletion der Ox Domäne von MtaC durch die Ox Domäne von MtaD komplementiert wird, stellte sich die Frage, wie die in der Melithiazolsynthetase wahrscheinlich vorhandene Ox Domäne zwischen den beiden Heterozyklen unterscheidet und bevorzugt den "rechten" Ring oxidiert.

Die Klonierung des Melithiazol-Biosynthesegenclusters schien auch aufgrund weiterer Fragestellungen interessant. Da in beiden Biosynthesen offensichtlich verschiedene Startereinheiten verwendet werden, könnte über einen biokombinatorischen Ansatz versucht werden, neue Strukturen zu erzeugen. Außerdem ließe sich die Entstehung des Methylesters im Melithiazol auf molekularer Ebene aufklären.

#### 4.6 Modell der Melithiazolbiosynthese

Melithiazol ist ein weiterer myxobakterieller Sekundärmetabolit des gemischten PK/NRP-Typs. Innerhalb der für die Biosynthese verantwortlichen PKS- und NRPS-Module wurden die in der Literatur definierten hochkonservierten Motive mit guter Übereinstimmung gefunden (siehe 3.20). Dabei konnten alle für den schrittweisen Zusammenbau von Melithiazol nötigen Proteindomänen identifiziert werden (siehe Tabelle 3.8). An der Melithiazolbiosynthese sind insgesamt sieben Module beteiligt

(siehe Abbildung 4.5). Es handelt sich dabei um vier PKS-Module und drei NRPS-Module, wobei die Module drei und vier von einem Leserahmen kodiert werden. Zu Beginn der Biosynthese wird das Intermediat von PKS (MelB) auf eine NRPS (MelC) übertragen. Wie auch schon beim Übergang von MtaB auf MtaC liegt hier ein PKS/NRPS-Hybrid vom Typ I vor (Du *et al.*, 2001; Du & Shen, 2001). Innerhalb von MelD erfolgt der Übergang der wachsenden Kette auf ein PKS Modul – ein weiteres Beispiel für ein NRPS/PKS-Hybrid vom Typ II (siehe auch MtaD). Nachdem das Intermediat von den PKSs MelE und MelF weiterprozessiert wurde, werden die letzten Schritte der Biosynthese wieder von einer NRPS (MelG) katalysiert.

Am N-Terminus einer Polyketidsynthase vom Typ I befindet sich das Lademodul, welches gewöhnlich von einer AT Domäne und einer ACP Domäne gebildet wird. Diese Domänenorganisation ist beispielsweise in DEBS 1, einem Protein der Erythromycinbiosynthese, verwirklicht (Hopwood, 1997). Es sind in der Literatur aber auch Biosynthesegencluster beschrieben, bei denen sich am N-Terminus des Lademoduls modifizierte  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase Domänen befinden (Bisang *et al.*, 1999). Wie in 4.2 erläutert, initiieren diese durch die Decarboxylierung aktivierter Dicarbonsäuren die Polyketidbiosynthese. Am N-Terminus von MelB, dem ersten Protein der Biosynthesemaschinerie, befindet sich ebenfalls eine KS Domäne. Bei dieser ist das hochkonservierte Motiv DxxCSSxL (Donadio *et al.*, 1991) jedoch unverändert. Ihre Funktion bei der Bildung von Melithiazol ist deshalb unklar. Wie bereits erwähnt, beginnt die Biosynthese myxobakterieller Sekundärmetabolite häufig mit ungewöhnlichen Startereinheiten (siehe 4.2). Diese entstehen u.a. durch Degradation verzweigtkettiger Aminosäuren. Deshalb wurde zu Beginn der Arbeiten spekuliert, dass in der Melithiazolbiosynthese Isobutyryl-CoA als Startereinheit dient, welches aus Valin hervorgehen könnte. Wann und wie es zur Bildung der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffen 2 und 3 des Starters kommt, ist unklar. Ein wahrscheinlicher Kandidat für diesen Oxidationsschritt ist ORF2, dessen abgeleitete Proteinsequenz Ähnlichkeiten zu Aminosäureoxidasen zeigt. Durch Fütterung von D8-DL-Valin konnte die Hypothese bestätigt werden, dass Valin eine Quelle für Isobutyryl-CoA darstellt (siehe 3.26). Folglich scheint im ersten Schritt die AT Domäne von MelB Isobutyryl-CoA als Substrat auszuwählen und auf die ACP Domäne zu laden.

Die folgenden Schritte der Melithiazolbiosynthese verlaufen analog zur der des Myxothiazols. Deshalb wird an dieser Stelle lediglich auf Besonderheiten

eingegangen. MelC enthält ebenso wie MtaC am N-Terminus eine Oxidationsdomäne. Das widersprach den Erwartungen, da alle von *M. lichenicola* Me I46 produzierten Melithiazole ein Thiazolin-Thiazol Heterozyklensystem enthalten. Die sich daraus ergebenden Aspekte werden in 4.11.7 diskutiert.

Da das am ACP von MelF befindliche Intermediat den Thioester der Säure anstatt des Methylesters darstellt, wurde zunächst erwartet, dass ein für eine Thioesterase kodierendes Gen oder Gene, die für die Bildung des endständigen Methylesters verantwortlich sind, stromabwärts von *melF* liegen würden. Das am 3'-Ende des Genclusters identifizierte *melG* kodiert jedoch für eine NRPS und zeigt große Ähnlichkeiten zu *mtaG*. Dessen Genprodukt ist in der Myxothiazolbiosynthese wahrscheinlich für die Entstehung des terminalen Säureamides nötig. Es schien deshalb möglich, dass im Verlauf der Melithiazolbiosynthese zunächst eine Amidzwischenstufe freigesetzt wird, aus welcher der endständige Methylester hervorgeht. Bei diesem ungewöhnlichen Mechanismus würde zunächst in einer ATP abhängigen Reaktion der Stickstoff des Säureamides angefügt und anschließend wieder entfernt werden. Für eine solche Umwandlung eines Säureamides in einen Methylester wären eine Hydrolase und eine Methyltransferase nötig. In der Tat zeigen die Genprodukte von *melJ* und *melK*, die direkt stromabwärts von *melH* lokalisiert sind, Ähnlichkeiten zu solchen Enzymen. Die Biosyntheseschritte, die zur Bildung des Moleküls von Melithiazol führen, werden in 4.9 diskutiert.

Die Bedeutung der ORFs 1, 3 und 4 für die Melithiazolbiosynthese, deren mögliche Funktionen in Tabelle 3.9 aufgelistet sind, ist unklar. Das von ORF2 abgeleitete Produkt könnte für die Entstehung der Doppelbindung innerhalb des Melithiazol-Starters verantwortlich sein (siehe Abbildung 4.5). Im Gegensatz dazu könnte ORF7, dessen abgeleitete Primärsequenz Ähnlichkeiten zu ABC-Transportern zeigt, für den Transport des Melithiazols aus der Zelle heraus nötig sein.

10 kb stromaufwärts und 25 kb stromabwärts des *mel* Clusters konnte kein ORF mit Ähnlichkeiten zu Phosphopantethein-Transferasen identifiziert werden. In Gegensatz dazu befindet sich am 5'-Ende des *mta* Clusters *mtaA*, das für eine Phosphopantethein-Transferase kodiert (Gaitatzis *et al.*, 2001; Silakowski *et al.*, 1999). MtaA modifiziert in *S. aurantiaca* DW4/3-1 nicht nur die Proteine der Myxothiazolbiosynthese, sondern auch die Biosynthesepoteine von zwei weiteren Sekundärmetaboliten posttranslational (Silakowski *et al.*, 2001). Die räumliche Nähe zwischen dem Gen, das für eine Phosphopantethein-Transferase kodiert, und dem

Biosynthesegencluster, dessen Proteine aktiviert werden, ist demnach nicht nötig. Analog kann davon ausgegangen werden, dass sich ein für eine Phosphopantethein-Transferase kodierendes Gen in *M. lichenicola* Me I46 an einer anderen Stelle im Chromosom befindet.

Die Gene *melB* bis *melH*, die alle in die gleiche Richtung abgelesen werden, sind ohne größere Abstände zueinander im Chromosom angeordnet. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass sie von einem gemeinsamen Promotor aus transkribiert werden. Dieser wurde in dem Sequenzabschnitt zwischen ORF4 und *melB* vermutet (siehe Abbildung 4.5). Ein weiterer (bidirektionaler) Promotor schien zwischen ORF7 und *melK* lokalisiert zu sein. Durch biokombinatorische Versuche in *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde bestätigt, dass sich sowohl zwischen ORF4 und *melB* als auch zwischen ORF7 und *melK* Promotorregionen befinden (siehe 4.7 und 4.9).

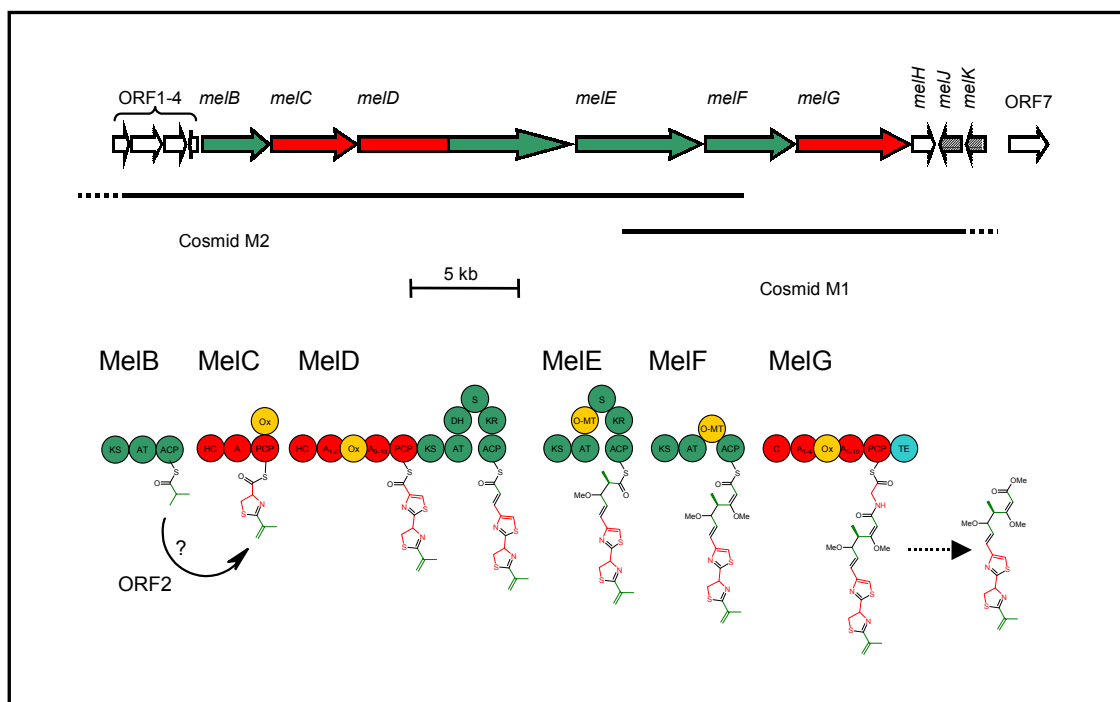


Abbildung 4.5 Modell der Melithiazolbiosynthese. PKS Module sind in grün und NRPS Module sind in rot dargestellt. ORFs mit unbekannter Funktion sind als weiße Pfeile dargestellt. ORFs, deren Funktion im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde, sind als schraffierte Pfeile abgebildet. Die TE Domäne ist in hellblau abgebildet. Die Inserts der Cosmide M1 und M2 werden durch schwarze Linien symbolisiert. Biosynthetische Bausteine, die von PKS Modulen eingebaut werden, sind mit grünen Bindungen dargestellt. Von NRPS Modulen inkorporierte biosynthetische Bausteine sind mit roten Bindungen abgebildet. Der mit dem Fragezeichen markierte Pfeil zeigt an, dass die Entstehung der Doppelbindung innerhalb der Startereinheit unklar ist. Der gepunktete Pfeil symbolisiert die Umwandlung des Säureamids in den Methylester, die in 4.9 diskutiert wird. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: ACP: Acyl Carrier Protein, KS:  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase, KR:  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Reduktase, AT: Acyltransferase, DH:  $\beta$ -Hydroxy-Acyl-ACP Dehydratase, O-MT: O-Methyltransferase, ER: Enoylreduktase, S: Spacer Region, PCP: Peptidyl Carrier Protein,

C: Kondensationsdomäne, HC: Heterozyklisierungsdomäne, A: Adenylierungsdomäne;  
Ox: Oxidationsdomäne; MOX: Monooxygenasedomäne; TE: Thioesterase

#### 4.7 Heterologe Expression von MelB in *S. aurantiaca* DW4/3-1

Das aus *M. lichenicola* Me I46 stammende Gen *melB* wurde einschließlich der zwischen *melB* und ORF4 vermuteten Promotorregion über homologe Rekombination vor *mtaC* integriert (siehe 3.22). Die an der Biosynthese von Myxothiazol und Melithiazol beteiligten Proteine sind sehr ähnlich zueinander (siehe Tabelle 3.11). Es schien deshalb wahrscheinlich, dass bei dieser Substitution eine Mutante entsteht, die ein Myxothiazolderivat produziert, in dem die Nonadienylseitenkette durch einen Isopropylrest ersetzt ist (siehe Abbildung 3.54).

Nach der ortsspezifischen Integration des Mutageneseplasmides pMSW17 in das Chromosom des Wildtypen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 bleiben alle Gene des *mta* Clusters intakt (siehe Abbildung 3.55). Deshalb sollte in dieser Mutante zusätzlich zum Myxothiazol ein Isopropylderivat gebildet werden. Die Mutanten waren Myxothiazol-positiv, was zeigt, dass der aus *M. lichenicola* Me I46 stammende Promotor in *S. aurantiaca* DW4/3-1 erkannt wird. Das erwartete Myxothiazolderivat mit der veränderten Seitenkette konnte jedoch nicht detektiert werden.

Das Mutageneseplasmid pMSW17 wurde so konstruiert, dass der C-terminale Linker von MtaB, der für dessen Andocken an MtaC nötig ist, mit MelB fusioniert wird. Somit können sowohl MtaB als auch das konstruierte MelB mit MtaC assoziieren. Um auszuschließen, dass MtaB MelB aus dem Synthetase-Komplex "verdrängt", hätte man idealerweise das Mutageneseplasmid in eine Mutante, in der das 3'-Ende von *mtaB* deletiert ist, elektroporieren müssen. Eine solche Deletionsmutante stand nicht zur Verfügung, deshalb wurde pMSW17 zusätzlich in die Mutante ESW414 (zur Konstruktion dieser Mutante siehe 3.9) transformiert, in der bis auf *mtaB* alle Gene des *mta* Clusters intakt sind. Wenn MelB mit den übrigen Proteinen der Myxothiazolsynthetase assoziiert, sollte die konstruierte Megasyntetase ausschließlich das erwartete Isopropylderivat des Myxothiazols produzieren. In der Doppelmutante konnte dieses Derivat nicht nachgewiesen werden. Es scheint, dass trotz der hohen Ähnlichkeit der an der Biosynthese beteiligten Proteine MtaC das Isopropylintermediat nicht als Substrat akzeptiert.



Da pMSW17 den ORF2, der Ähnlichkeiten zu Aminosäureoxidasen zeigt, nicht enthält, hätte man mit der gewählten Strategie ebenfalls die Entstehung der Doppelbindung innerhalb des Melithiazol-Starters untersuchen können. Bei erfolgreichem Ausgang dieses Experimentes war geplant, *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit einem Derivat von pMSW17 zu transformieren, das zusätzlich den ORF2 enthält. Im Extrakt dieser Mutante sollte ein Myxothiazolderivat, in dem die Triketidseitenkette durch einen 2-Isopropylrest ersetzt ist, nachgewiesen werden.

Um neue Strukturen zu erzeugen, können theoretisch auch Gene aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 in den Melithiazol Produzenten eingebracht werden. Da im Rahmen dieser Arbeit allerdings kein Protokoll zur genetischen Manipulation von *M. lichenicola* Me I46 etabliert werden konnte, war in Analogie zu dem oben beschriebenen Experiment ein Transfer von *mtaB* in den Melithiazol Produzenten nicht möglich.

In ähnlichen Experimenten war es Leadlay und Mitarbeitern gelungen, neue Erythromycinderivate zu erzeugen (Marsden *et al.*, 1998). In ihrer Studie haben die Autoren das Lademodul der 6-Desoxyerythronolid B Synthase (DEBS), das *in vivo* Propionyl-CoA und Acetyl-CoA als Substrate akzeptiert, durch das Lademodul der Avermectin-produzierenden PKS substituiert. Diese akzeptiert in der Avermectinbiosynthese in *Streptomyces avermitilis* zahlreiche Carbonsäuren als Startereinheiten (Dutton *et al.*, 1991). Die konstruierte Mutante produzierte 6 neue Erythromycinderivate in nachweisbaren Mengen. Demnach ist die Substratspezifität der Module 1 bis 6 der DEBS so gering, dass die veränderten Intermediate weiterprozessiert werden.

Khosla und Mitarbeiter haben das Lademodul der DEBS durch das Lademodul der Rifamycinsynthetase substituiert (Pfeifer *et al.*, 2001). Das Lademodul von RifA besteht aus einer CoA-Ligase Domäne, die spezifisch für 3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure ist, und einer ACP Domäne. Von dem konstruierten System wird ein Erythromycinderivat biosynthetisiert, das an der vorhergesagten Stelle den aromatischen Rest enthält. Wie bereits bei der Diskussion der Punktmutationen erwähnt, ist die DEBS offensichtlich gegenüber veränderten Substraten toleranter als die Myxothiazolsynthetase.

#### 4.8 Substitution der A Domäne in MtaD durch die A Domäne aus MelD

Die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Entstehung der Bisthiazoleinheit hatten gezeigt, dass die Ox Domäne von MtaC für die Myxothiazolbiosynthese entbehrlich und wahrscheinlich sogar inaktiv ist (vergleiche 4.5.2 und 4.5.3). Da sich die Ox Domänen von MtaC und MelC sehr stark ähneln und beide hinter der PCP Domäne inseriert sind, wird vermutet, dass beide Ox Domänen inaktiv sind. So ließe sich auch erklären, dass Melithiazol trotz einer Ox Domäne in MelC ein Thiazolin-Thiazol-System enthält. Möglicherweise ist die Ox Domäne von MtaD in der Lage, die Funktion der Ox Domäne von MtaC zu komplementieren. Daraus resultiert die Frage, wie die Ox Domäne von MelD zwischen den beiden Heterozyklen unterscheidet und nur das "rechte" Thiazolin oxidiert. Beim Sequenzvergleich von MtaD mit MelD fällt eine Deletion von insgesamt 11 Aminosäuren auf (siehe Abbildung 3.56). Um zu testen, ob diese Deletion für die unterschiedliche Aktivität verantwortlich sein könnte, wurde der für die A Domäne von MtaD kodierende Genabschnitt in *S. aurantiaca* DW4/3-1 durch den entsprechenden Genabschnitt aus *melD* ersetzt. Diese Substitution führte zu einem Nullproduzenten. Im Extrakt der Mutante konnte das erwartete Thiazolin-Thiazol-Myxothiazol nicht nachgewiesen werden.

In der Literatur sind bisher nur sehr wenige *in vivo* Experimente beschrieben worden, in denen durch die Substitution einzelner Domänen bzw. Module in NRPS/PKS-Hybridsystemen neue Strukturen erzeugt werden konnten. So konnte beispielsweise von Marahiel und Mitarbeitern durch Domänen-Substitution eine aktive Surfactinsynthetase konstruiert werden (Schneider *et al.*, 1998). Surfactin ist ein biogenetisches Hybrid, in dem ein cyclisches Heptapeptid mit einer  $\beta$ -Hydroxyfettsäure verknüpft ist. In ihrer Studie haben die Autoren die Leucin-spezifische A Domäne (einschließlich der nachfolgenden PCP Domäne) des ersten Moduls durch die Ornithin-spezifische A Domäne der Gramacidinsynthetase (einschließlich der nachfolgenden PCP Domäne) substituiert. Im Extrakt der erzeugten Mutante konnte das erwartete Surfactinderivat massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Jedoch war die Produktionsrate der Mutante deutlich niedriger als die des Wildtypen. Die Autoren erklären dies mit einer Störung der intermodularen Wechselwirkungen. Durch die Substitution eines ganzen Moduls ist es Golyshin und Mitarbeitern gelungen, aus der Surfactin- und der Lichenysinsynthetase ein Hybridsystem zu konstruieren, das so aktiv ist wie die natürlichen Biosynthesepoteine (Yakimov *et al.*,

2000). Die Autoren haben das für den Glutamateinbau verantwortliche Modul der Surfactinsynthetase durch dasjenige Modul ersetzt, welches in der Lichenysinbiosynthese für die Inkorporation von Glutamin nötig ist. Die Substitution von Glutamat durch Glutamin stellt eine marginale Veränderung dar, die innerhalb der Substratspezifität der Surfactinsynthetase liegt.

Zur Zeit werden myxobakterielle Gencluster bearbeitet, deren korrespondierende Naturstoffe einen Oxazolring enthalten (z. B. das Disorazol). Dies wird die Möglichkeit eröffnen, eine Cystein-spezifische A Domäne durch eine Serin-spezifische zu ersetzen. Möglich ist hier die Bildung eines oxazolhaltigen Myxothiazolderivates.

#### 4.9 Heterologe Expression von MelJ und MelK in *S. aurantiaca* DW4/3-1

Eine Frage war, wie der Methylester des Melithiazols entsteht. Da MelG starke Ähnlichkeiten zu MtaG zeigt, wurde angenommen, dass die Entstehung dieses Molekülteils wahrscheinlich über eine Amidzwischenstufe abläuft (siehe Abbildung 4.6). Für die Umwandlung des Melithiazol-Amides in den Methylester schienen eine Methyltransferase, die wahrscheinlich SAM als Cofaktor benötigt, und eine Hydrolase nötig. Die abgeleiteten Proteine von *melK* und *melJ*, die sich stromabwärts von *melG* befinden, zeigen tatsächlich Ähnlichkeiten zu solchen Enzymen. Die Abhängigkeit der Methylesterbildung von SAM konnte durch die Fütterung von [<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-Methionin mit anschließender <sup>13</sup>C-NMR-Analyse bewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Fütterungsexperimenten mit *Myxococcus fulvus* Mx f333/8, einem der wenigen Myxothiazol Z Produzenten (dem Methylesteranalogon von Myxothiazol A), erhalten (Steinmetz *et al.*, 2000).

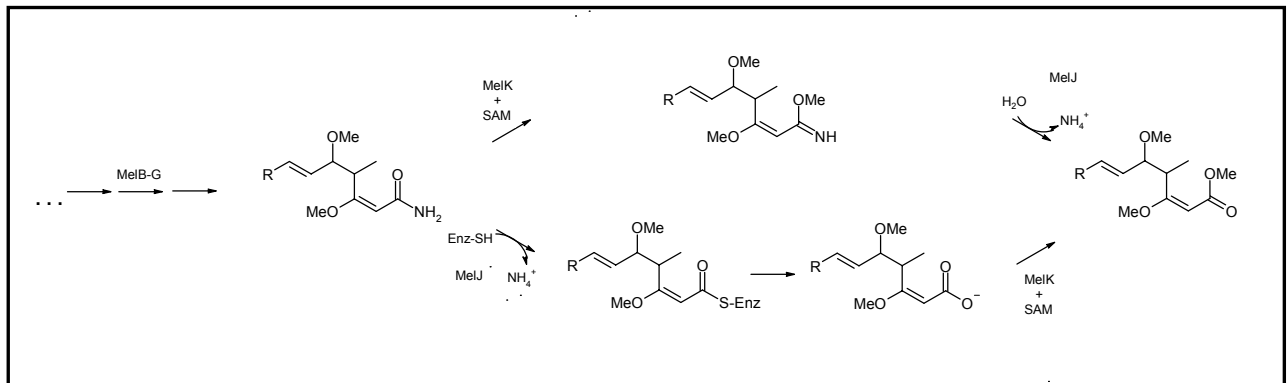


Abbildung 4.6 Modell für die Bildung eines Methylesters aus einem Säureamid. Die obere Route wurde von Höfle und Mitarbeitern postuliert (Steinmetz *et al.*, 2000). Alternativ könnte MelJ das Säureamid hydrolysieren, wobei MelK die dabei entstehende freie Säure anschließend methyliert (siehe Text).

In ihrer Studie postulieren die Autoren die Umwandlung von Myxothiazol A in Myxothiazol Z über einem Methyliminoester als Zwischenstufe. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen Myxothiazol Z und Melithiazol A könnte letzteres analog über ein Melithiazol-Amid gebildet werden. Dabei wäre ebenfalls ein Methyliminoester als Intermediat denkbar. Alternativ könnte die Bildung des Methylesters ähnlich der Methylierung cytosolischer Domänen bakterieller Chemorezeptoren ausgehend von der freien Säure ablaufen. So wird die Methylierung eines Chemotaxisrezeptors in *Salmonella typhimurium* durch die Methyltransferase CheR und die Esterase CheB gesteuert (Djordjevic & Stock, 1997; Koshland, 1988). Bei diesem alternativen Weg würde durch Katalyse von MelJ zunächst die freie Säure entstehen, die anschließend von MelK methyliert wird. MelJ gehört in die Nitrilase-Superfamilie, die auch Amidasen einschließt (siehe Abbildung 3.41).

Durch das Einbringen der Gene *melJ* und *melK* (einschließlich der vermuteten Promotorregion) in den Myxothiazol A Produzenten *S. aurantiaca* DW4/3-1 konnte gezeigt werden, dass die beiden abgeleiteten Proteine für die Umwandlung des Säureamides in den Methylester verantwortlich sind. Somit ist auch eindeutig gezeigt, dass tatsächlich das für die Melithiazolbiosynthese verantwortliche Gencluster kloniert und sequenziert wurde.

Welcher der beiden für die Umwandlung des Säureamides in den Methylester denkbaren Biosynthesewege durchlaufen wird, ist mit diesem Ergebnis nicht zu klären. Mutanten, in die nur *melK* eingebracht wurde, produzierten nicht den

erwarteten Methyliminoester. Zur Zeit wird *melJ* in *S. aurantiaca* DW4/3-1 transferiert. Außerdem wird versucht MelJ und MelK heterolog in *E. coli* zu exprimieren (Inga Müller, persönliche Mitteilung). Mit den gereinigten Proteinen sind Aktivitätstests geplant, die den genauen Ablauf der Methylesterbildung klären sollen. Erste Aktivitätstests mit Myxothiazol als Substrat deuten auf die freie Säure als Intermediat hin.

#### 4.10 Vergleich des Myxothiazol- und des Melithiazol-Biosynthesegenclusters

Die hohe Ähnlichkeit auf DNA- und auf Protein-Ebene sowie die identische Anordnung der Gene lassen vermuten, dass das *mta* und das *mel* Cluster auseinander hervorgegangen sind (siehe Tabelle 3.11). MtaB und MelB sind für die Bildung der Seitenketten verantwortlich, die in beiden Biosynthesen verschieden sind. MtaB besteht aus drei Modulen, während MelB lediglich ein Modul umfasst. Dennoch ähnelt MelB dem zweiten Verlängerungsmodul von MtaB am stärksten (vergleiche hierzu 4.11.1, 4.11.2 und Abbildung 4.9). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass MelB aus MtaB durch Deletion der beiden ersten Module und der reduktiven Schleife des zweiten Extensionsmoduls hervorgegangen ist. Alternativ könnte auch die Insertion der entsprechenden DNA-Abschnitte zur Entstehung von MtaB aus MelB geführt haben. Die Proteine MtaC-G und MelC-G, die sehr ähnlich zueinander sind, katalysieren wahrscheinlich analoge Reaktionen. Entsprechend sind die beiden Antibiotika in diesen Molekülabschnitten fast identisch. Aufgrund der durchgeführten Geninaktivierungsexperimente muss davon ausgegangen werden, dass MtaH nicht an der Myxothiazolbiosynthese beteiligt ist. Die Funktion des homologen MelH ist unklar.

Um Hinweise auf die Verwandtschaftsverhältnisse der Melithiazolsynthetase (MELS) und der Myxothiazolsynthetase (MTAS) zu erhalten, wurden die Domänen der beiden Megasyntetasen einer phylogenetischen Analyse unterzogen.

## 4.11 Vergleich der an der Myxothiazol- und Melithiazolbiosynthese beteiligten Domänen

### 4.11.1 Phylogenetischer Vergleich der KS Domänen

Es wird vermutet, dass die Module der Polyketidsynthasen durch Genduplikationen auseinander hervorgegangen sind (Hopwood, 1997). Deshalb würde man vermuten, dass die Domänen eines Biosynthesegenclusters untereinander ähnlicher sind als die aus verschiedenen Organismen stammenden Domänen. Im Dendrogramm gruppieren jedoch die KS Domänen homologer Proteine des *mel* und des *mta* Clusters miteinander. So sind z.B. die KS Domänen von MelE und MtaE ähnlicher zueinander, als die KS Domänen von MelE und MelF (siehe Abbildung 4.7). Offensichtlich sind die von den Proteinen katalysierten Reaktionen so ähnlich, dass interspezifische Unterschiede aufgehoben werden.

Die KS Domänen von MtaD und MelD unterscheiden sich von den übrigen KS Domänen (siehe Abbildung 4.7). Diese beiden Domänen sind im Protein an Stellen lokalisiert, an denen das wachsende Intermediat von einem NRPS- auf ein PKS-Modul übergeht. Weitere Domänen, die sich an einem solchen Übergang befinden, existieren im Verlauf der Biosynthesen nicht mehr. Möglicherweise liegt hierin der Grund für die Stellung im Dendrogramm. Die von Shen und Mitarbeitern durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen mit KS Domänen aus weiteren NRPS/PKS-Hybridproteinen bestätigen diese Beobachtung (Du *et al.*, 2001).

Der Sequenzvergleich der KS Domäne von MelB mit den übrigen drei KS Domänen der MELS und den fünf KS Domänen der MTAS zeigt, dass sowohl das hochkonservierte Cystein als auch die für die Funktionalität wichtigen polaren Aminosäuren, die bei der Kristallstrukturanalyse der  $\beta$ -Keto Acyl Synthase aus *E. coli* identifiziert wurden (Huang *et al.*, 1998), vorhanden sind. Somit kann über die mögliche Inaktivität dieser Domäne, welche im Hinblick auf die Struktur des Melithiazols überflüssig erscheint, nur spekuliert werden. Domänen ohne Abweichungen von beschriebenen Konsensus-Sequenzen, die nicht mit der chemischen Struktur korrelieren, befinden sich beispielsweise auch in der Rapamycin

Polyketid Synthase (RAPS). Dort handelt es sich allerdings um Domänen innerhalb reduktiver Schleifen (Aparicio *et al.*, 1996).

Dass die KS Domäne von MelB die höchste Ähnlichkeit zur KS<sub>2</sub> von MtaB zeigt, ist ein Hinweis auf den gemeinsamen Ursprung dieser beiden Domänen (siehe Abbildung 4.9).

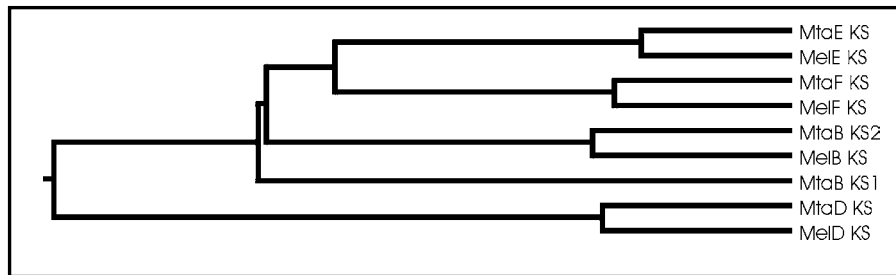


Abbildung 4.7 Phylogenetischer Vergleich der KS Domänen des *mta* und des *mel* Clusters.

#### 4.11.2 Phylogenetischer Vergleich der AT Domänen

Die phylogenetische Analyse der insgesamt zehn AT Domänen der MELS und der MTAS zeigt, dass diese gemäß ihrer Substratspezifität gruppieren. So bilden die Malonyl-CoA-spezifischen (in Abbildung 4.8 gelb unterlegt) und die Methylmalonyl-CoA-spezifischen (in Abbildung 4.8 rot unterlegt) AT Domänen eine Gruppe.

In den Abschnitten von *mtaD* und *mtaF*, die für die AT Domänen kodieren, existiert ein direkter Sequenzrepeat mit einer Länge von 1223 bp und einer Identität von 99,7 %. Im *mel* Cluster existieren in *melD* und *melF* ebenfalls direkte Sequenzwiederholungen, die auf eine Länge von 1222 bp zu 99,1 % identisch zueinander sind. Erstaunlicherweise sind die Sequenzwiederholungen der beiden Biosynthesegencluster untereinander nicht identisch. Auch zeigen sie keine höhere Ähnlichkeit untereinander als die kompletten Gene. Aufgrund dieser Sequenzwiederholungen ähneln die AT Domänen eines Genclusters einander am stärksten. Im Fall der AT Domänen von MtaE und MelE bildet sich - wie bereits bei den KS Domänen beobachtet - zwischen den beiden Genclustern ein Proteinpaar mit der höchsten Ähnlichkeit.

Dass die AT von MelB der AT<sub>3</sub> von MtaB trotz der unterschiedlichen Substratspezifität am stärksten ähnelt, weist wieder auf den gemeinsamen Ursprung von MelB und MtaB hin.

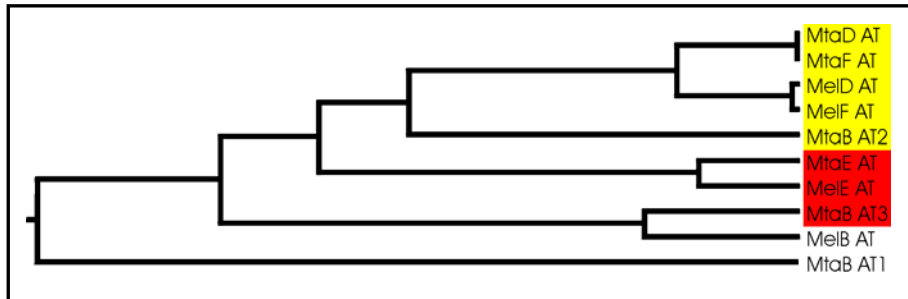


Abbildung 4.8 Phylogenetischer Vergleich der AT Domänen des *mta* und des *mel* Clusters. Die Malonyl-CoA-spezifischen AT Domänen sind gelb und die Methylmalonyl-CoA-spezifischen AT rot unterlegt. Die AT Domäne von MelB ist spezifisch für Isobutyryl-CoA. Das Substrat der AT<sub>1</sub> Domäne von MtaB stellt Isovaleryl-CoA dar.

#### 4.11.3 Phylogenetischer Vergleich der ACP Domänen

Auch der Vergleich der ACP Domänen lässt Rückschlüsse auf die Evolution von MtaB und MelB zu. So ist die ACP Domäne von MelB mit der ACP<sub>3</sub> Domäne von MtaB zu 64,2 % identisch. Im Gegensatz dazu beträgt ihre Identität zu der ACP<sub>1</sub> Domäne von MtaB lediglich 18 % und die zu der ACP<sub>2</sub> Domäne 24 %. Bereits die KS und die AT Domäne von MelB zeigten die höchste Ähnlichkeit zu den entsprechenden Domänen aus Modul 2 von MtaB. Deshalb liegt der Verdacht nahe, dass MelB durch Deletion der beiden ersten Module und der reduktiven Schleife des zweiten Extensionsmoduls aus MtaB (in Abbildung 4.9 dunkelgrün dargestellt) hervorgegangen ist. Die Entstehung von *mtaB* durch Insertion der entsprechenden DNA-Abschnitte in *melB* ist ebenfalls denkbar.





#### 4.11.5 Phylogenetischer Vergleich der DH Domänen

Die vier DH Domänen der MTAS und der MELS sind alle Bestandteil reduktiver Schleifen, die sich in ihrer Ausstattung mit optionalen Domänen nicht unterscheiden. Der Sequenzvergleich auf Aminosäureebene zeigt, dass das hochkonservierte Motiv funktionaler DH Domänen in den beiden DH Domänen von MtaB leicht abgewandelt ist (siehe 3.5.4). In dem Konsensusmotiv LxxHxxxGxxxxP ist das Prolin durch ein Alanin ersetzt. Das könnte ein Hinweis auf eine veränderte Funktionalität der DH Domänen von MtaB sein. Wenn diese die Dehydratisierung nicht wie eigentlich üblich zwischen den verknüpften Ketideinheiten katalysieren, lässt sich die ungewöhnliche Lage der Doppelbindungen in der Nonadienylseitenkette des Myxothiazols erklären (siehe Abbildung 3.35). Gestützt wird diese Hypothese durch die phylogenetische Analyse der DH Domänen. Das Dendrogramm zeigt, dass sich die DH<sub>2</sub> Domäne deutlich, die DH<sub>1</sub> Domäne sogar sehr deutlich von den übrigen DH Domänen unterscheidet. Um diesen Unterschied hervorzuheben, wurden weitere DH Domänen aus der Epothilonsynthetase und der Niddamycinsynthase in den Vergleich miteinbezogen (siehe Abbildung 4.11).

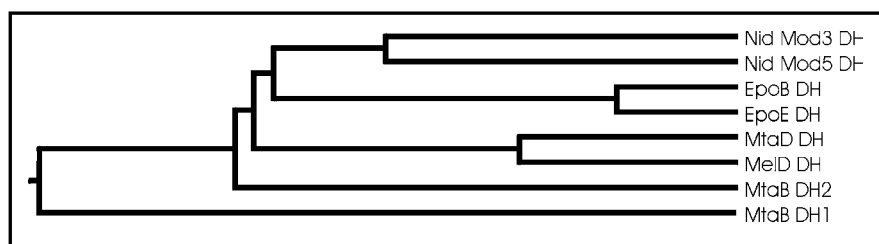


Abbildung 4.11 Phylogenetischer Vergleich der DH Domänen. Zusätzlich zu den DH Domänen der MELS und der MTS wurden die DH Domänen aus den Modulen 3 und 5 der Niddamycinsynthase und die DH Domänen von EpoB und EpoE miteinander verglichen.

#### 4.11.6 Phylogenetischer Vergleich der O-MT Domänen

Die in PKS Module inserierten O-MT Domänen wurden in 4.2 diskutiert.

#### 4.11.7 Vergleich der Ox Domänen

Die Ox Domänen erweitern das Repertoire an optionalen Domänen in NRPS Modulen. Der Vergleich der potentiellen Ox Domänen aus der MTAS und MELS mit der aus EpoP, zeigt die hohe Ähnlichkeit dieser Proteinabschnitte (siehe Abbildung 4.12). Die Primärsequenzen geben keinen Hinweis auf die vermutete Inaktivität der Ox Domänen von MtaC und MelC. Aufgrund der Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Experimente wird deshalb spekuliert, dass die Position dieses Domärentyps im Protein die Aktivität mitbeeinflusst. So sind die beiden Ox Domänen von MtaC und MelC am C-Terminus des jeweiligen Proteins lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind die Ox Domänen von MtaD, MelD und EpoP zwischen den hochkonservierten Motiven A8 und A9 der Adenylierungsdomänen inseriert.

Motiv		Ox-1
Konsensus		YxSA
Pos	18	
MtaC Ox	AQLEAPPEDEARRQCYFKRVSHRTFSAEPVEARVLAARLLSCLSPKVEGQL--KYQYGS	
MtaD Ox	LKKPEF--DEAFKRYMERQSAQSFLEPVSLERLSELLSCLMQIALEDSMPKRYASA	
MelC Ox	LPLEALGEDEELRRHLKRTSHRTFSSQPVDAKTGLRVSNLRPLELDGKR--KYQYGS	
MelD Ox	LRRPEA--DESLRKYTDRRSHRTFLSEPLTVSRIGDMLGCLMQSLDDFLQPKRYPSV	
EpoP Ox	LTGQDP--REAGLDVYARRRSVRTELEAPIPFVEFGRFLSCLSSVEPDGATLPKFRYPS	

Motiv	Ox-1
Konsensus	GxxYxVQxYx
Pos	76
MtaC Ox	GGIYGVQTYLSIATGRVRGLDAGAYYYDPLRHTLVQLGGASALPAALDSSANAAMASAA
MtaD Ox	GGLYPVQVYLHVKPGRVGGLAGGTYYYHPKRHELVLLTADAAMDRSQHASNRNRFVDA
MelC Ox	AGAYGVRLYLHVASGRVRGLDGGTYCHDPVRHALVRLSDTGALDMLHAKGNRALAASAA
MelD Ox	GGLYPVQAYLHLKPGAVEGLVGGTYYYHPKRHELVLLTPDVTLDRLGVAGNRSIFD
EpoP Ox	GSTYPVQTYAYVKSRIEGVDEGFYYYHPFEHRLKLS-DHGIERGAHVQRNFDVFEA

Motiv	Ox-2
Konsensus	xMxQLLxxxAxxxxxGxC
Pos	136
MtaC Ox	FSLYLVGDRRVISQRYGERWRDLALIEAGLMAQLLETRAESDLGLCQLEELRFEGLSKA
MtaD Ox	FSVFLVGKLSAIAPLYGSMARDFCMLEAGYMAQLLMSVAPAHKMGLCPIGVMDFEPLRSQ
MelC Ox	FSFFFVCDRRVLAPIHGEKWRDYALIEAGLMAQLLEMRA SDLDLGLCQVEAPRAEELRGV
MelD Ox	FSLFLVAQMSATTPLYGEYARDFCMLEAGYMAQLLMSSAPESQLGLCPVGGINFEPLRQA
EpoP Ox	FNLLFVGRIDATIESLYGSSSREFCLIEAGYMAQLLMEQAPSCNIGVCPVGQFNFEQVFPV

Pos	196
MtaC Ox	LRLEEEHMYLHGLVGGGLAWEEGAL.-
MtaD Ox	LALDEHHVLLHSFLGGGAVTAAAAAKP
MelC Ox	FQWEEHTLLHALVGGGLEWEEGSL.-
MelD Ox	FLLEQHVVLLHSFLGGGVDPASLAKP
EpoP Ox	LDLRHSDVYVHGMGLGGRVDPRQFQV--

Abbildung 4.12 Sequentieller Vergleich myxobakterieller Ox Domänen. Es sind nur die Proteinabschnitte mit signifikanten Ähnlichkeiten abgebildet. Aminosäuren, die in allen fünf Proteinen identisch sind, wurden gelb unterlegt. Aminosäuren, die in vier Proteinen identisch sind, wurden rot unterlegt. Zusätzlich sind die hochkonservierten Motive vermerkt (Du *et al.*, 2000).

Für die Ox Domäne von EpoP ist die Funktionalität biochemisch bewiesen worden (Chen *et al.*, 2001). Diese ist zu 38,9 % identisch mit der Ox MtaD und zu 39,3 % identisch mit der Ox MelD. Aufgrund der hohen Identitäten und der gleichen Position im jeweiligen Protein wird spekuliert, dass die Ox Domänen von MtaD und MelD analog für die Oxidation der intermediären Thiazoline zum Thiazol verantwortlich sind. Ob und wie dabei zwischen den beiden Heterozyklen unterschieden wird, bleibt unklar.

#### 4.11.8 Phylogenetischer Vergleich der HC Domänen

Entsprechend der Anzahl der Heterozyklen enthalten die MTAS und die MELS insgesamt vier HC Domänen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der katalysierten Reaktionen sind auch bei diesem Domänentyp die Domänen verschiedener Gencluster ähnlicher zueinander als die Domänen gleichen Typs eines Genclusters.

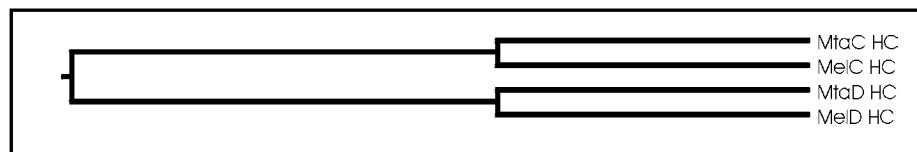


Abbildung 4.13 Phylogenetischer Vergleich der HC Domänen des *mta* und des *mel* Clusters.

#### 4.11.9 Die übrigen Domänen der MTAS und der MELS

Die C, MOX, PCP und die TE Domänen der MTAS und der MELS sind sehr ähnlich zueinander. Da der Vergleich dieser Domänen jedoch keine Hinweise auf die Evolution der beiden Biosynthesegencluster liefert, wird darauf nicht näher eingegangen.

## 5 Zusammenfassung

Bei einem Großteil der mikrobiellen Naturstoffe handelt es sich um Polyketide und nichtribosomal gebildete Peptide. Unser Wissen über die Stoffwechselwege, die zur Produktion dieser Substanzen führen, stammt hauptsächlich aus Untersuchungen, die mit Actinomyceten und Bacillen durchgeführt wurden. Durch die Untersuchung myxobakterieller Systeme wird unser Verständnis für die Biosynthese dieser Naturstoffe entscheidend erweitert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das für die Biosynthese des Elektronentransportinhibitors Myxothiazol in *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 verantwortliche Gencluster kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigt, dass der Atmungsketteninhibitor von einem Hybridsystem – bestehend aus mehreren Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen – biosynthetisiert wird. Die Abfolge der Domänen korreliert mit der chemischen Struktur des Myxothiazols. Außer bereits bekannten Domärentypen wurden zahlreiche neuartige Domänen identifiziert, mit denen sich die biosynthetischen Besonderheiten des Myxothiazols erklären lassen. Um die Funktionen der neuartigen Domänen untersuchen zu können, wurde ein Protokoll zur Erzeugung von markerlosen Mutationen unter Erhalt des Leserahmens in *S. aurantiaca* DW4/3-1 etabliert. Über den Nachweis erwarteter Myxothiazolderivate sollte dabei das jeweilige Postulat bestätigt werden. Bei der Analyse des Myxothiazolbiosynthesegenclusters durch markerlose Mutationen wurden zwei Gruppen von Mutanten erhalten. Eine dieser Gruppen produzierte unverändertes Myxothiazol (*mtaC* $\Delta$ Ox und *mtaH* $\Delta_{333-665}$ ). Im Gegensatz dazu bildeten die übrigen Mutanten weder Myxothiazol noch eines seiner erwarteten Derivate in detektierbaren Mengen. Da durch gerichtete Mutagenesen keine neuen Myxothiazolderivate erzeugt werden konnten, war es nicht möglich, die Funktionen der neuartigen Domänen eindeutig zu belegen. Die prinzipielle Durchführbarkeit von markerlosen Mutagenesen in *S. aurantiaca* DW4/3-1 über doppelte homologe Rekombination wurde in allen Fällen gezeigt. Die derzeitige Schlussfolgerung ist, dass es sich bei der Myxothiazolsynthetase um ein hochempfindliches System handelt, das nicht geeignet ist, veränderte Intermediate weiter zu prozessieren. Der Stamm *S. aurantiaca* DW4/3-1 produziert einen weiteren Naturstoff des gemischten PK/NRP-Typs und ein Polyketid (Silke Wenzel, Helge Bode, RM persönliche Mitteilung). Mit dem etablierten Protokoll können deren Biosynthesegencluster analysiert werden. Mit der *mtaC* $\Delta$ Ox-Mutante ist gezeigt, dass Mutationen innerhalb des *mta* Biosynthesegenclusters nicht zwangsläufig zu Nullproduzenten führen müssen. Da sich trotz der Deletion der Oxidationsgrad der Heterozyklen nicht ändert,

ist bewiesen, dass diese Domäne entbehrlich für die Biosynthese ist. Aufgrund eines zusätzlichen *in vitro* Experimentes muss angenommen werden, dass diese Domäne inaktiv ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Melithiazol-Biosynthesegencluster aus *Melittangium lichenicola* Me I46 identifiziert und analysiert. Melithiazol hemmt ebenso wie Myxothiazol die Atmungskette, zeichnet sich jedoch durch eine geringere Toxizität aus. Trotz großer struktureller Ähnlichkeit weisen Myxothiazol und Melithiazol signifikante Unterschiede auf. So unterscheiden sich die beiden Antibiotika in der Länge der Seitenketten, dem Oxidationsgrad des Heterozyklensystems und in ihren Molekülen. Der phylogenetische Vergleich des Myxothiazol- und des Melithiazolbiosynthesegenclusters zeigt, dass beide vermutlich auseinander hervorgegangen sind. In Übereinstimmung mit der Länge der jeweiligen Seitenkette besteht MtaB, das erste Protein der Myxothiazolbiosynthese, aus 3 Modulen, während MelB nur ein Modul trägt. So könnte MelB durch Deletion des Lademoduls, des ersten Moduls und der reduktiven Schleife des zweiten Moduls aus MtaB entstanden sein. Im umgekehrten Fall könnte eine Insertion der entsprechenden Module bzw. Domänen zur Entstehung von MtaB aus MelB geführt haben.

Aufgrund der durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Experimente zur Bildung des Bisthiazolsystems im Myxothiazol und der Tatsache, dass MelC ebenso wie MtaC eine potentielle Oxidationsdomäne am C-Terminus enthält, wird vermutet, dass Oxidationsdomänen, die hinter PCP Domänen lokalisiert sind, inaktiv sind. Im Gegensatz dazu scheinen Oxidationsdomänen, die in Adenylierungsdomänen inseriert sind – wie in MtaD und MelD –, aktiv zu sein. Die neuartige, von einer NRPS katalysierte Bildung des Säureamides von Myxothiazol nutzt Glycin als Stickstoffquelle. Dabei wird das intermediär gebundene Glycin von einer neuartigen Monooxygenasedomäne in seiner  $\alpha$ -Position hydroxyliert. Aus dem resultierenden Intermediat geht spontan oder durch Katalyse der Monooxygenasedomäne das Säureamid hervor. Unerwarteterweise läuft die Bildung der Methylester-Teilstruktur des Melithiazols ebenfalls über ein Amid-Intermediat. Durch heterologe Expression in *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde gezeigt, dass MelJ und MelK auch das Säureamid Myxothiazol A in sein Methylester Analogon (Myxothiazol Z) überführen. MelJ gehört zur Familie der Nitrilasen, die auch Amidasen umfasst. MelK gehört zu einer neuen Klasse von SAM-abhängigen Methyltransferasen, die keine typische Cofaktorbindestelle enthalten. Es wird vermutet, dass MelJ das Säureamid zur freien Säure hydrolysiert, die anschließend von MelK in einer SAM-abhängigen Reaktion methyliert wird.

## 6 Literatur

1. Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* **169**(1), 9-16.
2. Arslanian, R. L., Tang, L., Blough, S., Ma, W., Qiu, R. G., Katz, L., and Carney, J. R. (2002). A new cytotoxic epothilone from modified polyketide synthases heterologously expressed in *Myxococcus xanthus*. *J Nat Prod* **65**(7), 1061-4.
3. Asai, Mitsuko, Mizuta, E., Izawa, M., Haibara, K., and Kishi, T. (1979). Isolation, chemical characterization and structure of ansamitocin, a new antitumor ansamycin antibiotic. *Tetrahedron* **35**(9), 1079-1085.
4. August, P. R., Tang, L., Yoon, Y. J., Ning, S., Müller, R., Yu, T. W., Taylor, M., Hoffmann, D., Kim, C. G., Zhang, X., Hutchinson, C. R., and Floss, H. G. (1998). Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem Biol* **5**(2), 69-79.
5. Becker, W. F., von Jagow, G., Anke, T., and Steglich, W. (1981). Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E-beta-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Lett* **132**(2), 329-33.
6. Bevirt, D. J., Cortes, J., Haydock, S. F., and Leadlay, P. F. (1992). 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *Eur J Biochem* **204**(1), 39-49.
7. Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B., and Müller, R. (1999). Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim Biophys Acta* **1445**(2), 185-95.
8. Bibb, M. J., Findlay, P. R., and Johnson, M. W. (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**(1-3), 157-66.
9. Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N., and Schoner, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**(1), 43-9.
10. Bisang, C., Long, P. F., Cortes, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A. L., Cox, R. J., Simpson, T. J., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1999). A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* **401**(6752), 502-5.
11. Bohlendorf, B., Herrmann, M., Hecht, H. J., Sasse, F., Forche, E., Kunze, B., Reichenbach, H., and Höfle, G. (1999). Antibiotics from gliding bacteria, 85([not equivalent to]) - Melithiazols A-N: New antifungal beta-methoxyacrylates from myxobacteria. *European Journal of Organic Chemistry* (10), 2601-2608.
12. Böhm, I., Holzbaur, I. E., Hanefeld, U., Cortes, J., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1998). Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alteration of the stereospecificity of polyketide chain extension. *Chem Biol* **5**(8), 407-12.
13. Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., and Woods, C. M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* **55**(11), 2325-33.
14. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
15. Butler, A. R., Bate, N., and Cundliffe, E. (1999). Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Chem Biol* **6**(5), 287-92.
16. Byford, M. F., Baldwin, J. E., Shiau, C. Y., and Schofield, C. J. (1997). The Mechanism of ACV Synthetase. *Chem Rev* **97**(7), 2631-2649.
17. Cane, D. E. (1997). Introduction: Polyketide and Nonribosomal Polypeptide Biosynthesis. From Collie to Coli. *Chem Rev* **97**(7), 2463-2464.
18. Cane, D. E., and Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**(12), R319-25.

19. Challis, G. L., Ravel, J., and Townsend, C. A. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**(3), 211-24.
20. Chang, Z., Flatt, P., Gerwick, W., Nguyen, V., Willis, C., and Sherman, D. (2002). The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. *Gene* **296**(1-2), 235.
21. Chen, H., Keseler, I. M., and Shimkets, L. J. (1990). Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* **172**(8), 4206-13.
22. Chen, H., O'Connor, S., Cane, D. E., and Walsh, C. T. (2001). Epothilone biosynthesis: assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit on the EpoB subunit. *Chem Biol* **8**(9), 899-912.
23. Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A., and Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* **16**(14), 4174-83.
24. Cortes, J., Wiesmann, K. E., Roberts, G. A., Brown, M. J., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1995). Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* **268**(5216), 1487-9.
25. De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., Van Hoof, C., Waelkens, E., Merlevede, W., and Goris, J. (1999). Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* **38**(50), 16539-47.
26. de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C., and Grandi, G. (1997). Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J Biol Chem* **272**(40), 25304-9.
27. Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**(4), 455-63.
28. Djordjevic, S., and Stock, A. M. (1997). Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. *Structure* **5**(4), 545-58.
29. Doi-Katayama, Y., Yoon, Y. J., Choi, C. Y., Yu, T. W., Floss, H. G., and Hutchinson, C. R. (2000). Thioesterases and the premature termination of polyketide chain elongation in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J Antibiot (Tokyo)* **53**(5), 484-95.
30. Donadio, S., and Katz, L. (1992). Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **111**(1), 51-60.
31. Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J., and Katz, L. (1991). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**(5006), 675-9.
32. Du, L., Chen, M., Sanchez, C., and Shen, B. (2000). An oxidation domain in the BImIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol Lett* **189**(2), 171-5.
33. Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D. J., and Shen, B. (2000). The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol* **7**(8), 623-42.
34. Du, L., Sanchez, C., and Shen, B. (2001). Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab Eng* **3**(1), 78-95.
35. Du, L., and Shen, B. (2001). Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**(2), 215-28.
36. Dutton, C. J., Gibson, S. P., Goudie, A. C., Holdom, K. S., Pacey, M. S., Ruddock, J. C., Bu'Lock, J. D., and Richards, M. K. (1991). Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* **44**(3), 357-65.
37. Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* **6**(8), 775-84.
38. Fisher, A. J., Thompson, T. B., Thoden, J. B., Baldwin, T. O., and Rayment, I. (1996). The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *J Biol Chem* **271**(36), 21956-68.
39. Fujii, I. (1999) in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Sankawa, U., ed) Vol. 1, pp. 409-441, Elsevier, Oxford



40. Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* **400**(6747), 897-9.
41. Gaitatzis, N., Hans, A., Müller, R., and Beyer, S. (2001). The mtaA gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem (Tokyo)* **129**(1), 119-24.
42. Gaitatzis, N., Kunze, B., and Müller, R. (2001). In vitro reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20), 11136-41.
43. Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blocker, H., Höfle, G., and Müller, R. (2002). The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **277**(15), 13082-13090.
44. Gehring, A. M., DeMoll, E., Fetherston, J. D., Mori, I., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., Walsh, C. T., and Perry, R. D. (1998). Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **5**(10), 573-86.
45. Gehring, A. M., Mori, I., Perry, R. D., and Walsh, C. T. (1998). The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **37**(33), 11637-50.
46. Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H., and Trowitzsch, W. (1980). Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **33**(12), 1474-9.
47. Gerth, K., Jansen, R., Reifensahl, G., Höfle, G., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H., and Thierbach, G. (1983). The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* **36**(9), 1150-6.
48. Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S., and Müller, R. (2003). Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotechnol in press*
49. Ghisla, S., Thorpe, C., and Massey, V. (1984). Mechanistic studies with general acyl-CoA dehydrogenase and butyryl-CoA dehydrogenase: evidence for the transfer of the beta-hydrogen to the flavin N(5)-position as a hydride. *Biochemistry* **23**(14), 3154-61.
50. Gokhale, R. S., and Khosla, C. (2000). Role of linkers in communication between protein modules. *Curr Opin Chem Biol* **4**(1), 22-7.
51. Hardt, I. H., Steinmetz, H., Gerth, K., Sasse, F., Reichenbach, H., and Höfle, G. (2001). New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J Nat Prod* **64**(7), 847-56.
52. Haydock, S. F., Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., Khaw, L. E., König, A., Marsden, A. F., Galloway, I. S., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1995). Divergent sequence motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase domains in modular polyketide synthases. *FEBS Lett* **374**(2), 246-8.
53. Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, C., Nguyen, D. K., Aldrich, T., McAda, P. C., and Reeves, C. D. (1999). Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol* **6**(7), 429-39.
54. Higashide, E., Asai, M., Ootsu, K., Tanida, S., Kozai, Y., Hasegawa, T., Kishi, T., Sugino, Y., and Yoneda, M. (1977). Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from *Nocardia*. *Nature* **270**(5639), 721-2.
55. Höfle, G., and Reichenbach, H. (1995) in *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen* (Kuhn, W., and Fiedler, H. P., eds), pp. 61-78, Attempto Verlag Tübingen GmbH, Tübingen
56. Hopwood, D. A. (1997). Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev* **97**(7), 2465-2498.
57. Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1998). Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E.coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *Embo J* **17**(5), 1183-91.
58. Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T., and Omura, S. (1999). Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9509-14.
59. Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1987). The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J Antibiot (Tokyo)* **40**(1), 7-13.

60. Jager, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G., and Wohlleben, W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**(16), 5462-5.
61. Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J., and Kretz, P. L. (1992). XL1-Blue MRF<sup>+</sup> *E. coli* cells: MrcA<sup>+</sup>, MrcB<sup>+</sup>, Mrr<sup>+</sup>, HsdR<sup>+</sup> derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**, 81-83
62. Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L., and Khosla, C. (2000). Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *Gene* **249**(1-2), 153-60.
63. Kagan, R. M., and Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* **310**(2), 417-27.
64. Kakavas, S. J., Katz, L., and Stassi, D. (1997). Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*. *J Bacteriol* **179**(23), 7515-22.
65. Katz, L. (1997). Manipulation of Modular Polyketide Synthases. *Chem Rev* **97**(7), 2557-2575
66. Keating, T. A., and Walsh, C. T. (1999). Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **3**(5), 598-606.
67. Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C., and Hutchinson, C. R. (1999). Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**(5418), 1368-72.
68. Kim, H., Xia, D., Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1998). Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14), 8026-33.
69. Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., and Marahiel, M. A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol* **4**(12), 927-37.
70. Konz, D., and Marahiel, M. A. (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**(2), R39-48.
71. Koshland, D. E., Jr. (1988). Chemotaxis as a model second-messenger system. *Biochemistry* **27**(16), 5829-34.
72. Kulathila, R., Merkler, K. A., and Merkler, D. J. (1999). Enzymatic formation of C-terminal amides. *Nat Prod Rep* **16**(2), 145-54.
73. Kunze, B., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1987). The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **40**(3), 258-65.
74. Kunze, B., Jansen, R., Pridzun, L., Jurkiewicz, E., Hunsmann, G., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1992). Phenoxan, a new oxazole-pyrone from myxobacteria: production, antimicrobial activity and its inhibition of the electron transport in complex I of the respiratory chain. *J Antibiot (Tokyo)* **45**(9), 1549-52.
75. Kunze, B., Kemmer, T., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1984). Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **37**(5), 454-61.
76. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
77. Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**(11), 923-36.
78. Li, S. M., Westrich, L., Schmidt, J., Kuhnt, C., and Heide, L. (2002). Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: new coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology* **148**(Pt 10), 3317-26.
79. Li, Y. M., Milne, J. C., Madison, L. L., Kolter, R., and Walsh, C. T. (1996). From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274**(5290), 1188-93.
80. Ligon, J., Hill, S., Beck, J., Zirkle, R., Molnar, I., Zawodny, J., Money, S., and Schupp, T. (2002). Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26. *Gene* **285**(1-2), 257-67.
81. Lin, L. Y., Sulea, T., Szittner, R., Vassilyev, V., Purisima, E. O., and Meighen, E. A. (2001). Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data. *Protein Sci* **10**(8), 1563-71.
82. Mahmud, T., Bode, H. B., Silakowski, B., Kroppenstedt, R. M., Xu, M., Nordhoff, S., Höfle, G., and Müller, R. (2002). A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid

- biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J Biol Chem* **277**(36), 32768-74.
83. Mandel, M., and Leadbetter, E. R. (1965). Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria. *J Bacteriol* **90**(6), 1795-6.
  84. Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., and Mootz, H. D. (1997). Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* **97**(7), 2651-2673
  85. Marsden, A. F., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1998). Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase. *Science* **279**(5348), 199-202.
  86. Martin, J. L., and McMillan, F. M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol* **12**(6), 783-93.
  87. McCurdy, H. D., and Wolf, S. (1967). Deoxyribonucleic acid base compositions of fruiting Myxobacterales. *Can J Microbiol* **13**(12), 1707-8.
  88. Merkler, D. J., Glufke, U., Ritenour-Rodgers, K. J., Baumgart, L. E., DeBlassio, J. L., Merkler, K. A., and Vederas, J. C. (1999). Formation of nicotinamide from nicotinuric acid by peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM): A possible alternative route from nicotinic acid (niacin) to NADP in mammals. *Journal of the American Chemical Society* **121**(20), 4904-4905
  89. Miller, D. A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T. A., and Walsh, C. T. (2002). Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **9**(3), 333-44.
  90. Mocek, U., Knaggs, A. R., Tsuchiya, R., Nguyen, T., Beale, J. M., and Floss, H. G. (1993). Biosynthesis of the Modified Peptide Antibiotic Nosiheptide in *Streptomyces actuosus*. *J. Am. Chem. Soc.* **115**(17), 7557-7568
  91. Molnar, I., Aparicio, J. F., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Schwecke, T., Konig, A., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1996). Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* **169**(1), 1-7.
  92. Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D. D., Gorlach, J., Mayo, J. M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J., and Ligon, J. M. (2000). The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol* **7**(2), 97-109.
  93. Moore, B. S., and Hopke, J. N. (2001). Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem* **2**(1), 35-8.
  94. Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**(21), 6843-50.
  95. Mootz, H. D., Schwarzer, D., and Marahiel, M. A. (2000). Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11), 5848-53.
  96. Namikoshi, M., and Rinehart, K. L. (1996). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **17**(5-6), 373-384
  97. Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E. (1998) in *Escherichia coli and Salmonella* Vol. 1, pp. 2051-2053, ASM Press, Washington, D.C
  98. Neumann, B., Pospiech, A., and Schairer, H. U. (1992). Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends Genet* **8**(10), 332-3.
  99. Neumann, B., Pospiech, A., and Schairer, H. U. (1992). Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J Bacteriol* **174**(19), 6307-10.
  100. Pace, H. C., and Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol* **2**(1), REVIEWS0001.
  101. Paitan, Y., Alon, G., Orr, E., Ron, E. Z., and Rosenberg, E. (1999). The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. *J Mol Biol* **286**(2), 465-74.
  102. Pascal, R. A., Jr., and Walsh, C. T. (1984). Mechanistic studies with deuterated dihydroorotates on the dihydroorotate oxidase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* **23**(12), 2745-52.
  103. Patel, H. M., and Walsh, C. T. (2001). In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry* **40**(30), 9023-31.
  104. Pfeifer, B. A., Admiraal, S. J., Gramajo, H., Cane, D. E., and Khosla, C. (2001). Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* **291**(5509), 1790-2.

105. Pospiech, A., Bietenhader, J., and Schupp, T. (1996). Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **142**(Pt 4), 741-6.
106. Pradella, S., Hans, A., Sproer, C., Reichenbach, H., Gerth, K., and Beyer, S. (2002). Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch Microbiol* **178**(6), 484-92.
107. Purwantini, E., and Daniels, L. (1998). Molecular analysis of the gene encoding F-420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* **180**(8), 2212-2219.
108. Quadri, L. E., Sello, J., Keating, T. A., Weinreb, P. H., and Walsh, C. T. (1998). Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **5**(11), 631-45.
109. Qualls, G. T., Stephens, K., and White, D. (1978). Light-stimulated morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Science* **201**(4354), 444-5.
110. Qualls, G. T., Stephens, K., and White, D. (1978). Morphogenetic movements and multicellular development in the fruiting Myxobacterium, *Stigmatella aurantiaca*. *Dev Biol* **66**(1), 270-4.
111. Reichenbach, H. (1984) in *Myxobacteria, Development and Cell Interaction*, pp. 1-50, Springer Verlag, New York
112. Reichenbach, H. (1986). The myxobacteria: common organisms with uncommon behaviour. *Microbiol Sci* **3**(9), 268-74.
113. Reichenbach, H., and Höfle, G. (1993) in *Myxobacteria II* (Dworkin, M., and Kaiser, D., eds), pp. 347-397, American Society for Microbiology, Washington, D.C
114. Reichenbach, H., and Höfle, G. (1999) in *Drug Discovery from Nature* (Grabley, S., and Thiericke, R., eds), pp. 149-179, Springer Verlag, Berlin
115. Ringel, S. M., Greenough, R. C., Roemer, S., Connor, D., Gutt, A. L., Blair, B., Kanter, G., and von, S. (1977). Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **30**(5), 371-5.
116. Roper, D. I., and Cooper, R. A. (1993). Purification, nucleotide sequence and some properties of a bifunctional isomerase/decarboxylase from the homoprotocatechuate degradative pathway of *Escherichia coli* C. *Eur J Biochem* **217**(2), 575-80.
117. Roy, R. S., Gehring, A. M., Milne, J. C., Belshaw, P. J., and Walsh, C. T. (1999). Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat Prod Rep* **16**(2), 249-63.
118. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
119. Sasse, F., Bohlendorf, B., Herrmann, M., Kunze, B., Forche, E., Steinmetz, H., Höfle, G., Reichenbach, H., and Hermann, M. (1999). Melithiazols, new beta-methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from myxobacteria. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **52**(8), 721-9.
120. Sasse, F., Steinmetz, H., Heil, J., Höfle, G., and Reichenbach, H. (2000). Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **53**(9), 879-85.
121. Sasse, F., Steinmetz, H., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1995). Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* **48**(1), 21-5.
122. Schlegel, H. G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
123. Schneider, A., and Marahiel, M. A. (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **169**(5), 404-10.
124. Schneider, A., Stachelhaus, T., and Marahiel, M. A. (1998). Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol Gen Genet* **257**(3), 308-18.
125. Schupp, T., Toupet, C., Cluzel, B., Neff, S., Hill, S., Beck, J. J., and Ligon, J. M. (1995). A *Sorangium cellulosum* (myxobacterium) gene cluster for the biosynthesis of the macrolide antibiotic soraphen A: cloning, characterization, and homology to polyketide synthase genes from actinomycetes. *J Bacteriol* **177**(13), 3673-9.
126. Scrutton, N. S., Berry, A., and Perham, R. N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**(6253), 38-43.
127. Shigekawa, K., and Dower, W. J. (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**(8), 742-51.
128. Shimkets, L. J. (1993) in *Myxobacteria II* (Dworkin, M., and Kaiser, D., eds), pp. 85-107, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

129. Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22), 10104-8.
130. Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**(51), 32678-84.
131. Silakowski, B., Ehret, H., and Schairer, H. U. (1998). *fbfB*, a gene encoding a putative galactose oxidase, is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation. *J Bacteriol* **180**(5), 1241-7.
132. Silakowski, B., Kunze, B., and Müller, R. (2001). Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene* **275**(2), 233-40.
133. Silakowski, B., Nordsiek, G., Kunze, B., Blocker, H., and Müller, R. (2001). Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: the myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15. *Chem Biol* **8**(1), 59-69.
134. Silakowski, B., Schairer, H. U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Höfle, G., Beyer, S., and Müller, R. (1999). New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem* **274**(52), 37391-9.
135. Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *Faseb J* **8**(15), 1248-59.
136. Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**(8), 493-505.
137. Staunton, J., and Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**(4), 380-416.
138. Steinmetz, H., Forche, E., Reichenbach, H., and Höfle, G. (2000). Biosynthesis of myxothiazol Z, the ester-analog of myxothiazol A in *Myxococcus fulvus*. *Tetrahedron* **56**(12), 1681-1684.
139. Strohl, W. R. (1997) *Biotechnology of Antibiotics*, 2<sup>nd</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc., New York
140. Stryer, L. (1999) *Biochemie*, 4. Ed., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin
141. Tame, J. R., Namba, K., Dodson, E. J., and Roper, D. I. (2002). The crystal structure of HpcE, a bifunctional decarboxylase/isomerase with a multifunctional fold. *Biochemistry* **41**(9), 2982-9.
142. Tang, L., Yoon, Y. J., Choi, C. Y., and Hutchinson, C. R. (1998). Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene* **216**(2), 255-65.
143. Tanner, J. J., Miller, M. D., Wilson, K. S., Tu, S. C., and Krause, K. L. (1997). Structure of bacterial luciferase beta 2 homodimer: implications for flavin binding. *Biochemistry* **36**(4), 665-72.
144. Thierbach, G., and Reichenbach, H. (1981). Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **638**(2), 282-9.
145. Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Börner, T., and Neilan, B. A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol* **7**(10), 753-64.
146. Trowitzsch, W., Reifensahl, G., Wray, V., and Gerth, K. (1980). Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). II. structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **33**(12), 1480-90.
147. Trowitzsch-Kienast, W., Wray, V., Gerth, K., Reichenbach, H., and Höfle, G. (1986). Biosynthese des Myxothiazols in *Myxococcus fulvus* Mx f16. *Liebigs Ann. Chem* **1986**, 93-98.
148. Tsuji, S. Y., Cane, D. E., and Khosla, C. (2001). Selective protein-protein interactions direct channeling of intermediates between polyketide synthase modules. *Biochemistry* **40**(8), 2326-31.
149. Tsuji, S. Y., Wu, N., and Khosla, C. (2001). Intermodular communication in polyketide synthases: comparing the role of protein-protein interactions to those in other multidomain proteins. *Biochemistry* **40**(8), 2317-25.
150. Ueki, T., Inouye, S., and Inouye, M. (1996). Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene* **183**(1-2), 153-7.
151. Vahlensieck, H. F., Pridzun, L., Reichenbach, H., and Hinnen, A. (1994). Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr Genet* **25**(2), 95-100.
152. Vieira, J., and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
153. von Dohren, H., Keller, U., Vater, J., and Zocher, R. (1997). Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem Rev* **97**(7), 2675-2706.
154. Weckesser, J., Martin, C., and Jakobi, C. (1996). Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **19**(2), 133-138.

155. Wilkinson, C. J., Frost, E. J., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (2001). Chain initiation on the soraphen-producing modular polyketide synthase from *Sorangium cellulosum*. *Chem Biol* **8**(12), 1197-208.
156. Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., and Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**(9), 3469-78.
157. Wu, S. S., and Kaiser, D. (1996). Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis* sacB gene. *J Bacteriol* **178**(19), 5817-21.
158. Xue, Y., Zhao, L., Liu, H. W., and Sherman, D. H. (1998). A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21), 12111-6.
159. Yadav, G., Gokhale, R. S., and Mohanty, D. (2003). Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *J Mol Biol* **328**(2), 335-63.
160. Yakimov, M. M., Giuliano, L., Timmis, K. N., and Golyshin, P. N. (2000). Recombinant acylheptapeptide lichenysin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**(2), 217-24.
161. Yu, T. W., Bai, L., Clade, D., Hoffmann, D., Toelzer, S., Trinh, K. Q., Xu, J., Moss, S. J., Leistner, E., and Floss, H. G. (2002). The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12), 7968-73.
162. Yu, T. W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B. S., Richard Hutchinson, C., and Floss, H. G. (1999). Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 9051-6.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn PD Dr. Rolf Müller in der Abteilung Molekularbiologie der Myxobakterien der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig angefertigt.

Ich danke Rolf Müller für die engagierte Betreuung und das rege Interesse am Fortgang der Arbeit während des gesamten Zeitraumes.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Höfle möchte ich mich für die Durchführung der HPLC-MS Analysen und die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. Jahn danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Dr. B. Kunze möchte ich mich für die Unterstützung bei der phänotypischen Analyse der (wirklich) vielen Mutanten bedanken.

Herrn Dr. F. Sasse danke ich für die Ratschläge bei der Kultivierung des Melithiazol-Produzenten.

Herrn Dr. F. Groß, Silke Wenzel und Maren Kopp danke ich für das Korrekturlesen und die kritischen Anmerkungen zu diesem Manuskript.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Institutes, deren Namen hier unerwähnt bleiben, die aber auf irgendeine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Nikolaos Gaitatzis, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und Claudia Rütten danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.